

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

N° D'ORDRE : 43

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Raymond MICHEL

ASSISTANT DE BIOCHIMIE GÉNÉRALE ET COMPARÉE
AU COLLÈGE DE FRANCE
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

1^{re} Thèse : **Contribution à la Biochimie des Iodoprotéines et des Acides Aminés Iodés.**

2^{me} Thèse : **Etude critique des Méthodes chimiques de Dosages du Glycocolle, de l'Alanine et de la Sérine.**

Soutenues le 7 avril 1948, devant la Commission d'examen.

MM. A. TIAN, *Président.*

P. ROUARD,
P. DESNUELLE, } *Examineurs.*
J. ROCHE,

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1950

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Nom du Candidat : **MICHEL**

Prénom : **Raymond**

Date de la soutenance : **7 Avril 1948**

Numéro d'ordre : **43**

MICHEL (Raymond).

Contribution à la Biochimie des Iodoprotéines et des Acides aminés Iodés. — *Lonsle-Saunier, imp. M. Declume, 1950. In-8°, 136 p., 20 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 43).

MICHEL (Raymond).

Contribution à la Biochimie des Iodoprotéines et des Acides aminés Iodés. — *Lonsle-Saunier, imp. M. Declume, 1950. In-8°, 136 p., 20 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 43).

MICHEL (Raymond).

Contribution à la Biochimie des Iodoprotéines et des Acides aminés Iodés. — *Lonsle-Saunier, imp. M. Declume, 1950. In-8°, 136 p., 20 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 43).

MICHEL (Raymond).

Contribution à la Biochimie des Iodoprotéines et des Acides aminés Iodés. — *Lonsle-Saunier, imp. M. Declume, 1950. In-8°, 136 p., 20 fig.*

(Thèse de sciences, Marseille, 1948, n° 43).

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

N° D'ORDRE : 43

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Raymond MICHEL

ASSISTANT DE BIOCHIMIE GÉNÉRALE ET COMPARÉE
AU COLLÈGE DE FRANCE
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

1^{re} Thèse : **Contribution à la Biochimie des Iodoprotéines et des Acides Aminés Iodés.**

2^{me} Thèse : **Etude critique des Méthodes chimiques de Dosages du Glycocolle, de l'Alanine et de la Sérine.**

Soutenues le 7 avril 1948, devant la Commission d'examen.

MM. A. TIAN, *Président.*

P. ROUARD,

P. DESNUELLE,

J. ROCHE,

} *Examineurs.*

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1950



UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur :

M. Fr. MARTY,

Maître de Conférences de Mathématiques
(14 juin 1940)

Doyen et Professeur honoraire :

M. A. MARCHAUD

Professeurs honoraires :

MM. CAULLERY, PERES, PETIT, SEVE, KOLLMANN, BOSLER

Doyen : M. P. CHOUX

Assesseur : M. P. ROUARD

Secrétaire : M. H. LANFRANCHI

Professeurs :

MM. A. TIAN	Chimie générale.
E. TRAYNARD	Calcul différentiel et intégral.
L. MARGAILLAN	Chimie industrielle.
G. CORROY	Géologie et Minéralogie.
P. CHOUX	Botanique générale.
R. THIRY	Mécanique rationnelle.
R. CERIGHELLI	Astronomie.
P. ROUARD	Physique générale.
J. VALENSI	Mécanique des fluides.
P. DESNUELLE	Chimie biologique.
M. ABELOOS	Zoologie générale.
R. MERIGOUX	Physique industrielle.

Professeurs sans Chaire :

C. JAUSSERAN	Physique P. C. B.
A. FAVRE	Météorologie et mécanique de l'atmosphère.

Chargés de Cours :

P. BENOIT	Physiologie.
E. CALVET	Chimie P. C. B.
C. FEHRENBACH	Astronomie.

Maîtres de Conférences :

J. M. PERES	Biologie animale.
R. MOLINIER	Biologie végétale.
M. EGER	Mathématiques.

Maître de Conférences-adjoint :

J. TIMON-DAVID	Zoologie agricole.
---------------------	--------------------

Chargés de Conférences :

J. ROUCH	Océanographie.
M ^{me} S. TAXY	Géographie physique.
G. MALCUIT	Botanique appliquée.
B. GOUZON	Physiologie.
C. GOUVERNET	Géologie.

Maîtres de Conférences honoraires :

MM. E. MEISSONIER, H. BIMAR, D. RICARD, R. PADOVA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MA FEMME

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE

PROFESSEUR AU COLLÈGE DE FRANCE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

INTRODUCTION

Protéines thyroïdiennes et iodoprotéines artificielles.

Le traitement empirique du goître par les cendres d'éponges au XVIII^e siècle, puis par l'iode au début du XIX^e laissait entrevoir une relation physiologique possible entre cet halogène et le corps thyroïde. La preuve définitive de cette corrélation fut fournie longtemps après par BAUMANN [16] qui mit en évidence, en 1895, la présence d'iode en quantité beaucoup plus grande dans le corps thyroïde que dans les autres organes. En effet, cette glande renferme plus de 10 p. 100 de l'iode total de l'organisme d'un homme, son poids étant seulement égal à 0,03 p. 100 de celui-ci.

OSWALD [145] montra, quelques années plus tard, que la plus grande partie de l'iode thyroïdien est fixé à une protéine particulière : la thyroglobuline. Cette protéine qui constitue « la colloïde » de la glande décrite par les histologistes représente 70-80 p. 100 du poids sec de l'extrait aqueux de l'organe et possède les propriétés biologiques de la thyroïde. Son ingestion supprime les accidents caractéristiques du myxœdème et augmente l'intensité du métabolisme de base. Ultérieurement GUDERNATSCH [61-62] établit qu'elle provoque la métamorphose des amphibiens et se comporte, à cet égard, comme spécifique de l'organe dont elle provient.

La présence d'iode dans la thyroglobuline attira aussitôt l'attention de nombreux chercheurs, mais leurs efforts se portèrent principalement sur le fractionnement des produits de dégradation iodés de la protéine. Les essais poursuivis dans ce domaine avaient pour but d'isoler le principe actif du corps thyroïde et l'étude de l'iodoprotéine elle-même fut pendant longtemps délaissée.

BAUMANN [16] [17], sépara de l'hydrolysât acide des protéines thyroïdiennes des substances iodées actives mais mal

définies. Après lui, d'autres auteurs [87, 88, 145, 146, 147, 148] ne connurent pas davantage de succès.

Beaucoup plus tard KENDALL [95] [96] [97] réussit le premier à cristalliser le principe hormonal thyroïdien — la thyroxine — à partir du précipité insoluble obtenu après acidification des produits de l'hydrolyse alcaline de la thyroglobuline. Ce composé renfermant 65 p. 100 d'iode est doué des propriétés physiologiques des extraits totaux thyroïdiens.

Par la suite HARINGTON [64] décrit d'abord une méthode permettant d'améliorer le rendement en thyroxine, puis entreprit [65] l'étude systématique de ses produits de dégradation ce qui lui permit d'établir sa constitution, la thyroxine étant de l'acide 3,5 diiodo-4[3',5',diiodo-(4'hydroxy)phénoxy]-phényl- α aminopropionique.

En collaboration avec BARGER [70], HARINGTON réalisa la synthèse de ce corps et montra que le produit obtenu était doué des mêmes propriétés que la thyroxine retirée des glandes. Cependant le composé préparé, soit par synthèse, soit à partir des hydrolysats de protéines thyroïdiennes était sans action sur la lumière polarisée, il restait donc à obtenir la thyroxine optiquement active. HARINGTON et SALTER [78] parvinrent à isoler après hydrolyse enzymatique de la thyroglobuline la thyroxine naturelle L $[\alpha]_D = -3^{\circ},5$. HARINGTON [66] réussit également à séparer les deux isomères optiques du produit synthétique et vérifia l'identité complète des propriétés du dérivé L avec la thyroxine naturelle.

Les activités des extraits thyroïdiens se retrouvèrent essentiellement dans le précipité acide de l'hydrolysats alcalin qui contient environ 50 p. 100 de l'iode total thyroïdien sous forme de thyroxine. Par contre, la partie acidosoluble est pratiquement sans action dans le traitement du myxœdème ainsi que sur le métabolisme de base. Or les deux fractions étant également iodées il était évident qu'un autre constituant halogéné inactif devait se trouver en solution dans la fraction acido-soluble. En effet, à partir de celle-ci HARINGTON et RANDALL [76, 77] cristallisèrent un autre acide aminé iodé qu'ils identifièrent à la 3,5 diiodotyrosine. Ce même composé avait été isolé par DRECHSEL [55] en 1896, de l'axe corné du squelette de certains coraux (*Gorgonia CAVOLINI*) et dénommé par lui acide iodogorgénique, WHEELER et JAMIESON [196] et HENZE [83] montrèrent qu'il s'agissait de la 3,5 diiodotyrosine. La diiodotyrosine naturelle présente dans la thyroglobuline

est le dérivé L. Ce produit n'est doué que d'une activité physiologique très faible, qualitativement identique à certaines activités du corps thyroïde total ou de la thyroxine et antagoniste d'autres. C'est ainsi qu'il accélère les métamorphoses des amphibiens à très forte dose, mais qu'il diminue l'augmentation du métabolisme basal provoquée par l'ingestion de poudre de thyroïde.

HARINGTON et RANDALL [77] entreprirent une étude quantitative des expériences qui aboutirent à l'isolement de la 3,5 diiodotyrosine à partir de l'hydrolysate de thyroglobuline. Ils conclurent que la thyroxine et la diiodotyrosine devaient être les seuls composés iodés présents dans les protéines thyroïdiennes ce qui leur permit de reprendre l'hypothèse émise antérieurement par HARINGTON sur la formation de la première à partir de deux molécules de la deuxième.

Depuis lors aucun nouveau composé iodé n'a été isolé de la thyroglobuline, toutefois on ne peut pas affirmer qu'elle soit rigoureusement dépourvue d'aucun autre. De plus, au cours de ces dernières années l'utilisation d'iode radioactif et l'étude du mode d'action des substances antithyroïdiennes [92] [58] [102] [163] comme le thiouracile, n'ont pas apporté de démenti au schéma précédent de formation de l'hormone, bien que son mécanisme complet demeure encore mal défini.

Somme toute l'intérêt biochimique du corps thyroïde s'est concentré sur l'étude des acides aminés iodés qu'il a été possible d'en extraire, alors que la préparation et les propriétés de la thyroglobuline n'ont fait l'objet que de rares travaux où les tests de pureté des protéines isolées n'ont pas été pleinement établis [145] [80] [39] [40] [41].

Avant même la préparation de la thyroxine pure, les biochimistes, pressentant que la thyroglobuline tenait ses propriétés particulières de la présence d'iode dans sa molécule, ont cherché à obtenir des produits analogues [87] [145] [25] [26] [148] à l'iodoprotéine naturelle en fixant de l'iode à d'autres protéines ou à renforcer l'activité de la protéine thyroïdienne en l'iodant [88].

Les premiers travaux sur l'ioduration des protéines ont porté sur deux problèmes distincts. D'une part, il importait de connaître si la fixation de l'iode à une protéine quelconque lui conférait automatiquement ou dans des conditions particulières toutes ou seulement certaines activités biologiques du corps thyroïde. D'autre part le mécanisme de la combinaison

de l'halogène à la protéine méritait également d'être élucidé [86] [145] [100] [101].

Mais pendant longtemps la similitude d'action physiologique entre les protéines artificiellement iodées et la thyroglobuline n'a pas été clairement dégagée de résultats confus et contradictoires. Il est probable que la méconnaissance du rôle des parathyroïdes ou l'emploi de préparations plus ou moins souillées d'iode libre ont à cet égard compliqué les observations. Par ailleurs, HOFMEISTER [86], OSWALD [145] et les premiers chercheurs qui ont fixé de l'iode aux protéines ont adopté un point de vue en harmonie avec les conceptions et les connaissances de l'époque sur la constitution de ces corps, en essayant de relier l'halogénéation à des réactions de substitution portant sur des acides aminés particuliers et à des réactions d'oxydation simples. Cependant, malgré les imperfections que nous venons de signaler, certaines de ces recherches serviront utilement de base aux travaux ultérieurs. C'est ainsi que les tests utilisés pour la mise en évidence des activités biologiques au cours des premiers essais demeurent encore employés pour les déterminations quantitatives de celles-ci. De même, les méthodes de préparation des protéines iodées bien qu'améliorées, n'ont pas été par la suite profondément modifiées.

En 1916 ROGOFF et MARINE [186], montrèrent les premiers de façon certaine que l'albumine iodée accélérât les métamorphoses des batraciens avec une activité comparable à celle de la fraction acido-insoluble de l'hydrolysât alcalin thyroglobulinique. Il n'est donc pas surprenant, puisque l'année précédente KENDALL [95] [96] avait obtenu la thyroxine cristallisée à partir de cette dernière, que différents auteurs fussent amenés par la suite à admettre que ce corps, ou un produit voisin, devait prendre naissance au cours de l'ioduration.

LUDWIG et VON MUTZENBECHER [114] [115], en isolant la thyroxine des hydrolysats barytiques de différentes protéines artificiellement iodées, ont apporté à l'étude de cette question une contribution fondamentale, tant par ses répercussions biologiques que par son importance chimique.

En effet la présence de l'hormone thyroïdienne dans les iodo-protéines artificielles devait donner une impulsion nouvelle aux recherches physiologiques. C'est ainsi qu'elles furent développées en Amérique sous la direction de REINEKE [165] [166] [167] [168] [169] [173] dans le but d'augmenter la teneur des produits en thyroxine, et en Angleterre [159] [22] [23]

[94] pour leur applications vétérinaires, en raison de leur influence sur la croissance des jeunes animaux, sur la lactation et la ponte.

Au point de vue chimique le résultat des auteurs allemands montre que la fixation de l'iode sur la protéine n'est pas uniquement due à une simple substitution mais se complique d'une série de processus secondaires d'oxydation. Par ailleurs l'obtention par LUDWIG et VON MUTZENBECHER [115] de la 3.5 diiodotyrosine et surtout d'un nouvel acide aminé iodé la 3-monoiodotyrosine, à partir des hydrolysats des protéines iodées, traduit la complexité des réactions qui se produisent au cours de l'halogénéation. *Le schéma complet du mécanisme de la formation de la thyroxine et de ses précurseurs par ioduration des protéines n'a pas été complètement élucidé.*

L'étude comparée des protéines iodées naturelles et artificielles ne peut être faite que si l'on connaît avec assez de précision les unes et les autres. Or l'étude de la thyroglobuline n'a fait l'objet que d'un petit nombre de travaux, de sorte que l'on doit la considérer comme aussi incomplète que celle des protéines iodées.

Il ressort de la brève mise au point de l'état actuel de nos connaissances, que de nombreux problèmes posés par l'existence d'iodoprotéines naturelles et par la formation d'iodoprotéines physiologiquement actives *in vitro* ne sont pas encore résolus.

Il en est ainsi pour plusieurs raisons. D'une part, les dosages actuels de la thyroxine, dont certains sont assez laborieux, exigent pour être suffisamment précis la mise en œuvre de quantités importantes de produits et ne paraissent pas s'appliquer de manière satisfaisante aux iodoprotéines artificielles. Le dosage de la diiodotyrosine n'a été réalisé jusqu'ici qu'avec une précision médiocre dans les produits thyroïdiens et il n'a pas été appliqué aux protéines artificiellement iodées. Enfin la monoiodotyrosine n'a été dosée dans aucun de ces corps.

D'autre part, aucune étude quantitative de la formation des acides aminés iodés, au cours de l'halogénéation progressive *in vitro* des iodoprotéines n'a été poursuivie faute de moyens analytiques le permettant.

Enfin l'étude des protéines thyroïdiennes doit être considérée comme à peine ébauchée et il est actuellement difficile de baser sur elle une conception permettant de se représenter de manière entièrement satisfaisante le mécanisme biologique de la transformation de tyrosine en thyroxine.

PLAN DES RECHERCHES.

Le plan de nos recherches découle de cette discussion sur les protéines iodées naturelles ou artificielles.

Nous exposerons dans une première partie l'établissement de micro-méthodes de dosage de la thyroxine, de la diiodotyrosine, de la monoiodotyrosine dans les protéines thyroïdiennes et les iodoprotéines artificielles. Des méthodes particulièrement adaptées à chacune de celles-ci ont été établies à partir de l'étude des propriétés des trois acides aminés iodés et de l'hydrolyse des protéines qui les renferment.

Une deuxième partie sera consacrée à l'exposé de travaux portant sur les réactions conduisant à la fixation de l'iode dans diverses conditions. Il comprendra, en particulier, des recherches sur la formation de la monoiodotyrosine et de la diiodotyrosine et sur la formation de la thyroxine à partir des premières.

Nous décrirons dans une troisième partie la préparation et les propriétés de la thyroglobuline extraite d'organes normaux ou pathologiques de divers animaux. Nous essaierons enfin de discuter le mécanisme biologique de la formation de la thyroxine à partir de l'ensemble des résultats obtenus.

PREMIÈRE PARTIE.

Dosage colorimétrique de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine. Application aux protéines iodées.

Les thyroglobulines renferment de la thyroxine et de la 3.5 diiodotyrosine et, par ailleurs, la 3.monoiodotyrosine a été isolée des protéines artificiellement iodées. Plusieurs méthodes permettent de déterminer la teneur en thyroxine et en diiodotyrosine des unes des autres, tandis qu'il n'en existe encore aucune pour y doser la monoiodotyrosine.

Avant d'entreprendre la discussion des travaux antérieurs, il nous paraît utile de résumer les principales propriétés des trois acides aminés iodés, en particulier celles mises à profit pour leur dosage par voie chimique.

I. Thyroxine. — La thyroxine cristallise en gerbes et en rosettes. Elle est presque insoluble dans l'eau pure, totalement dans l'eau faiblement acétique. Insoluble dans la plupart des solvants organiques, elle est cependant extractible par le n. butanol, plus difficilement par l'acétate d'éthyle. Elle est assez stable même à chaud en milieu alcalin, en présence de baryte plus que de soude, sans doute par suite de la faible solubilité du sel de baryum. L'hydrazine ou le stannite de sodium, à chaud, désiodent quantitativement la thyroxine. Celle-ci forme avec les bases deux séries de sels (mono et di) dont ceux de sodium basique sont solubles dans les mélanges hydroalcooliques. La faible solubilité dans l'eau du sel monobasique a été utilisée par ailleurs, au cours de la purification de la thyroxine. Le dérivé argentique est complètement insoluble. Elle fournit avec les acides, des sels plus solubles en présence d'alcool qu'en milieu aqueux pur. Comme les acides aminés, elle donne une réaction bleue violacée avec la ninhydrine et comme celles de nombreux o-diiodophénols, ses solutions chlorhydri-

ques alcooliques se colorent en jaune orangé par addition de nitrite de sodium et virent ensuite au rouge par alcalinisation à l'ammoniaque.

II. 3.5 Diiodotyrosine. — La diiodotyrosine cristallise avec un nombre plus ou moins grand de molécules d'eau selon le milieu à partir duquel on l'isole. Ses cristaux en forme d'aiguilles prismatiques sont plus solubles dans l'eau que ceux de tyrosine, la diiodotyrosine présente des caractères plus acides que celle-ci, son pK étant voisin de 4.2. Elle est stable en milieu très alcalin même à chaud, cependant elle est assez facilement détruite par chauffage à pH 8. L'alcool n.butylique l'extrait de sa solution acide mais très faiblement de sa solution alcaline. L'acide phosphotungstique, l'acétate de plomb et les sels d'argent la précipitent incomplètement. Elle est désiodée quantitativement à chaud en donnant naissance à de la tyrosine, soit par l'hydrogène en présence de carbonate de calcium et de palladium, ou par le stannite de sodium, soit par SO_4H_2N ou par l'hydrazine. Elle ne donne pas la réaction de MILLON, mais présente par contre une réaction positive à la ninhydrine et celle aux ions nitreux commune à de nombreux o.diiodophénols.

III. Monoiodotyrosine. (3.iodyrosine). — La 3.iody.L tyrosine cristallise anhydre, en navettes ou en losanges tandis que la 3.iody-DL-tyrosine cristallise avec une molécule d'eau, en forme de prismes, de rosettes et souvent de navettes. Les solubilités de la 3.iodytyrosine sont intermédiaires entre celles de la diiodotyrosine et celles de la tyrosine ; c'est ainsi qu'elle est plus difficilement extractible d'une solution acide par le n.butanol que la première, mais cette extraction est plus facile que pour la seconde. Elle donne la réaction de MILLON comme la tyrosine et ne présente pas la réaction des o-diiodophénols aux ions nitreux commune à la thyroxine et à la diiodotyrosine mais sa désioduration s'effectue dans les mêmes conditions.

Le dosage chimique des acides aminés iodés dans les protéines pose deux problèmes distincts : d'une part, leur mise en liberté par hydrolyse et d'autre part, leur détermination proprement dite. Les diverses solutions préconisées ont été l'application des propriétés particulières que nous venons de rappeler.

Pour la commodité de l'exposé, nous réunirons les différen-

tes méthodes de dosage particulières à chacun des acides aminés.

A. — Dosages de la thyroxine.

Aucune des méthodes proposées pour le dosage de la thyroxine n'est basée sur la constitution de ce corps. Aussi sa détermination dans les protéines iodées ne peut elle être effectuée qu'après hydrolyse. Celle-ci comporte d'ailleurs deux conditions, d'une part la stabilité de la thyroxine au cours du chauffage avec l'agent d'hydrolyse et d'autre part sa complète libération de la molécule protéique par action de celui-ci.

A. — HYDROLYSE.

a. STABILITÉ. — La thyroxine se décompose facilement en milieu acide. LELAND et FOSTER [107] indiquent en effet que 38 p. 100 de cet acide aminé sont détruits par chauffage à l'ébullition dans $\text{SO}_4\text{H}_2\text{2N}$ pendant 18 heures. C'est pour cette raison que les bases ont été généralement utilisées tant pour l'isolement de la thyroxine que pour certaines opérations de son dosage.

1°) *Action de la soude.* — La stabilité de l'acide aminé pur en présence de soude a été étudiée en détail par LELAND et FOSTER [107], puis par BLAU [20] [21]. Leurs résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Normalité de la soude employée	Temps de chauffage à l'ébullition	Thyroxine détruite en p. 100
N	18 heures	4,4
N	63 —	40
2N	6 —	10
2N	18 —	25,4

Il ressort de l'examen de ces chiffres que la thyroxine n'est pas très stable en milieu sodique. La libération complète des protéines iodées par action de la soude à chaud entraîne toujours une perte plus ou moins importante. Un autre élément empêche de connaître avec certitude la quantité de thyroxine réellement détruite dans des conditions expérimentales définies. En effet, alors qu'il est possible de récupérer 83 p. 100 de thyroxine quand celle-ci est ajoutée à de la poudre de thy-

roïde, l'hydrolyse étant effectuée dans NaOH 2 N ; 75 p. 100 seulement sont retrouvés avec NaOH N. Aussi LELAND et FOSTER [107] considèrent-ils que l'hydrolyse par NaOH 2 N est préférable à celle par NaOH N.

2°) *Action de la baryte.* — HARINGTON [64] a utilisé le premier avec succès la baryte comme agent d'hydrolyse mais l'étude de la stabilité de la thyroxine pure chauffée avec $\text{Ba}(\text{OH})_2, 8\text{H}_2\text{O}$ n'a été entreprise [21] que beaucoup plus tard. Par chauffage à l'ébullition, pendant 6 heures, avec de la baryte à 8 p. 100, 3 p. 100 environ de thyroxine sont détruits ; alors que 7 p. 100 environ le sont en présence de baryte à 40 p. 100, par hydrolyse au bain-marie bouillant pendant 20 heures. Lorsque l'hydrolyse de diverses protéines additionnées de thyroxine est effectuée, à l'ébullition pendant 6 heures, avec $\text{Ba}(\text{OH})_2, 8\text{H}_2\text{O}$ à 8 p. 100, 91 p. 100 de l'acide aminé iodé sont retrouvés. Dans tous les cas la baryte a un effet destructeur moindre sur la thyroxine que la soude, sans doute à cause de l'insolubilité du sel de baryum.

b. LIBÉRATION DE LA MOLÉCULE PROTÉIQUE. — Les résultats de l'action des alcalis sur la thyroxine seule ou ajoutée à des protéines doivent être complétés par l'étude de la libération de l'acide aminé compris dans la molécule protéique elle-même. BLAU [21] étudia l'hydrolyse de la poudre de thyroïde par NaOH, 5 N, 2 N, $\text{Ba}(\text{OH})_2, 8\text{H}_2\text{O}$ à 8 p. 100. Des dosages simultanés de la thyroxine et de l'azote aminé ont montré qu'après traitement de 6 heures par $\text{Ba}(\text{OH})_2, 8\text{H}_2\text{O}$ le rendement maximum en thyroxine est atteint, bien qu'il n'y ait alors que 55 p. 100 d'azote aminé libéré, tandis que 18 heures sont nécessaires pour obtenir le même résultat par NaOH 2 N avec 70 p. 100 d'azote aminé. L'hydrolyse par NaOH 0,5 N fournit des chiffres inférieurs. L'iodoprotéine est donc hydrolysée de façon différente selon l'agent alcalin mis en œuvre.

c. CONDITIONS PARTICULIÈRES D'HYDROLYSE. — HARINGTON et RANDALL [75] ont proposé d'utiliser NaOH N 4 heures à l'ébullition. Dans ce cas la thyroxine n'est pas détruite mais elle n'est probablement pas entièrement libérée. BRAND et KASSELL [34] préconisent NaOH 5 N pendant 20 heures à 100° C en tube scellé, ce qui comporte la libération totale de l'acide aminé, mais une importante destruction de celui-ci.

Les conditions adoptées par LELAND et FOSTER [107], et à l'échelle microanalytique par TREVOROW [195] et TAUROG

[193], comportent une hydrolyse par NaOH 2 N, pendant 18 heures à l'ébullition, ce qui a pour conséquence de libérer la thyroxine en totalité, mais avec une perte minimum de 17 p. 100 environ.

Pour libérer la thyroxine des iodoprotéines artificielles REINEKE et TURNER [171] ont utilisé la baryte à 40 p. 100 ce qui conduit à une perte d'au moins 7 p. 100 et la formation de produits de destruction d'autres acides aminés iodés pouvant interférer dans son dosage.

En résumé, il est préférable d'utiliser la baryte pour hydrolyser les protéines iodées en vue de la détermination de la thyroxine puisque, d'une part, elle détruit moins cet acide aminé que la soude et que, d'autre part, elle la libère plus rapidement de la molécule protéique. Les conditions les meilleures qui découlent de l'exposé des travaux précédents, et qui ont été adoptées par BLAU, sont l'hydrolyse des protéines thyroïdiennes par la baryte à 8 p. 100 pendant 6 heures à l'ébullition, la perte en thyroxine étant dans ce cas inférieure à 5 p. 100. Cependant, comme nous le verrons par la suite, l'emploi de la baryte n'est pas toujours possible.

B. — DOSAGE PROPREMENT DIT.

Les diverses méthodes de détermination de la thyroxine dans les iodoprotéines naturelles ou artificielles, à l'exception de celle de BRAND et KASSEL [34], comportent la séparation de l'acide aminé des autres composés iodés et le dosage de l'halogène dans la fraction contenant le premier.

La plus ancienne technique élaborée par HARRINGTON et RANDALL [75] est basée sur l'insolubilité de la thyroxine à pH 4.5 (*), pH auquel la diiodotyrosine n'est que faiblement soluble. Elle conduit à des résultats trop élevés car la diiodotyrosine précipite en même temps que la thyroxine soit par adsorption soit en combinaison peptidique avec la thyroxine.

La modification proposée par BLAU [21] et consistant à doser l'iode acido-insoluble dans l'hydrolysât barytique des protéines thyroïdiennes représente une amélioration notable du point de vue théorique mais, comme le signale cet auteur, de réalisation pratique délicate.

L'application de l'une ou l'autre de ces méthodes aux pro-

(*) Le pH est voisin du pK OH de la diiodotyrosine. On précipite ce corps dans ces conditions au cours de sa préparation.

téines artificiellement iodées a fourni des résultats inconstants ne permettant pas d'évaluer de manière satisfaisante leur teneur en thyroxine [159] [52].

La solubilité de la thyroxine dans le butanol a servi de base à d'autres méthodes. L'hydrolysât alcalin des iodoprotéines naturelles obtenu dans les conditions indiquées par LELAND et FOSTER [107] est extrait directement par du n.butanol. Les liqueurs butanoliques contiennent alors toute la thyroxine libre et, en plus, un peu de diiodotyrosine, laquelle est éliminée par un lavage ultérieur à la soude normale. Après évaporation du butanol le dosage de l'iode dans le résidu sec permet d'évaluer ainsi la teneur en thyroxine. Les résultats obtenus sont environ 50 p. 100 plus faibles que ceux de la méthode d'HARRINGTON et RANDALL [75], ce qu'explique en partie la destruction de la thyroxine au cours de l'hydrolyse sodique prolongée.

D'après BLAU [20], une acidification préalable à pH 3,5 de l'hydrolysât obtenu selon LELAND et FOSTER [107] permet une meilleure solubilisation de la thyroxine dans le butanol, mais 80 p. 100 de la diiodotyrosine présente sont également extraits. On peut néanmoins l'éliminer complètement par deux lavages avec NaOH 5 N. Cependant les chiffres obtenus par BLAU [20] sont à peine supérieurs à ceux publiés par LELAND et FOSTER [107]. Aussi l'intérêt de cette modification serait-il resté limité sans des travaux qui en ont élargi le champ d'application. En effet, BLAU [21] a adopté par la suite la baryte au lieu de la soude pour hydrolyser les iodoprotéines naturelles. Le sel de baryum de la thyroxine étant insoluble dans le butanol, on acidifie l'hydrolysât par HCl jusqu'à pH 3,5-4,0, ce qui libère la thyroxine que l'on extrait alors de façon satisfaisante. La teneur en thyroxine déterminée sur un même échantillon de poudre de thyroïde est beaucoup plus élevée par cette méthode que celle obtenue par la technique de LELAND et FOSTER [107], mais inférieure à celle trouvée par le procédé de HARRINGTON et RANDALL [75]. La discussion portant sur les hydrolysats et les contrôles effectués par BLAU permettent de considérer cette méthode comme la meilleure de celles préconisées jusqu'ici pour le dosage de la thyroxine dans les protéines thyroïdiennes, mais elle ne peut être mise en œuvre que sur au moins cinq milligrammes de thyroxine.

Par la suite REINEKE et ses collaborateurs [172] ont montré que cette méthode ne pouvait pas être appliquée aux iodoprotéines artificielles. Les teneurs de thyroxine obtenues sont

trop élevées et ne correspondent pas à l'activité biologique des produits analysés. Ces auteurs incriminent l'hydrolyse qu'ils considèrent comme insuffisante, peut-être s'agit-il plutôt d'une destruction incomplète des dérivés iodés de l'histidine lesquels seraient partiellement solubles dans le butanol, car l'acide aminé non iodé est entièrement décomposé par chauffage prolongé dans la baryte. Une hydrolyse préalable de 20 heures au bain-marié bouillant par de la baryte à 40 p. 100 suivi du dosage de l'iode dans les conditions réglées par BLAU [21] donnerait des résultats satisfaisants. C'est là à notre connaissance la seule méthode proposée pour doser la thyroxine par voie chimique dans les protéines artificiellement iodées ; sa spécificité toutefois n'est pas démontrée car, au cours de l'hydrolyse, certains produits iodés solubles dans le butanol sont également libérés. Ainsi PITT RIVERS [157] a isolé un corps iodé, la 3.5 diiodohydroxybenzaldéhyde, extractible par le butanol (*).

D'autres méthodes de dosage de la thyroxine reposant sur des principes différents ont été proposés. Elles consistent à libérer l'halogène de cet acide aminé par un réducteur tel que l'hydrazine ou le stannite de sodium. Avec le premier réactif PAAL et MOTZ [152] ont montré que la désioduration est complète par chauffage à l'ébullition pendant une heure avec NaOH N en présence d'hydrazine, le dosage des iodures formés permet indirectement de déduire la quantité de thyroxine analysée. Cette technique fournit des résultats satisfaisants avec le corps pur, elle ne peut pourtant pas être appliquée à sa détermination dans les iodoprotéines naturelles et artificielles, car la diiodotyrosine est désiodée dans les mêmes conditions que la thyroxine, en sorte que sa séparation est nécessaire pour déterminer celle-ci. Les différents composés iodés qu'elles renferment la rendent absolument inutilisable dans le cas des iodoprotéines artificielles.

Nous ne signalerons ici que pour mémoire les dosages biologiques de la thyroxine, basés sur l'augmentation des échanges gazeux d'animaux éthyroïdés, sur la métamorphose de têtards de batraciens ou la perte de poids consécutive à l'administration de ce produit. L'exposé critique de ces méthodes sort du cadre de cette mise au point [188].

(*) Antérieurement SALTER [188] avait réussi à obtenir cristallisé, d'un hydrolysât barytique de sérumalbumine iodée, un composé se rapprochant par l'analyse élémentaire et les propriétés du produit obtenu par PITT RIVERS.

B. — Dosages de la diiodotyrosine.

La stabilité de la diiodotyrosine au cours du chauffage dans les alcalis concentrés n'a pas été étudiée de façon systématique ; selon LUGG [119] la diiodotyrosine ne donne pas la réaction de MILLON, même après un chauffage de 20 heures à 100° C ; elle est donc stable dans ces conditions. PITT RIVERS et HARRINGTON [73] ont étudié la stabilité de la diiodotyrosine au cours du chauffage à différents *pH*, la destruction est de 80 p. 100 après ébullition d'une heure à *pH* 7.5.

Les différents auteurs qui ont proposé des méthodes de dosage de cet acide aminé ont admis plus ou moins implicitement que ce composé n'était pas altéré par l'hydrolyse alcaline.

Ces diverses méthodes de dosage de la diiodotyrosine comportent, comme celle de BRAND et KASSEL [34] la désioduration de cet acide aminé et la détermination de la tyrosine qui prend naissance au moyen de la réaction de MILLON. Elles exigent cependant la séparation de la diiodotyrosine et de la thyroxine ou la mise en œuvre de conditions telles que ce dernier composé n'intervienne pas. C'est ainsi que BLOCK a adopté la méthode de LUGG [119] pour doser la diiodotyrosine dans les protéines thyroïdiennes après action du stannite de sodium, la thyroxine étant préalablement extraite au moyen de *n. butanol*.

PAAL et MOTZ [152] ont montré que la diiodotyrosine comme la thyroxine est quantitativement désiodée par chauffage en milieu sodique par l'hydrazine.

Nous avons basé [113] sur ce fait une technique de dosage. Après élimination de l'excès d'hydrazine par du nitrite de sodium et de ce dernier réactif par l'urée, la détermination de la tyrosine est effectuée par la microméthode de BERNHART [19].

De même la désioduration de la diiodotyrosine par chauffage 20 heures à l'ébullition au bain de paraffine à 140° C avec SO_4H_2 8 N a servi de base à une technique que nous avons proposée [184].

Cependant toutes les méthodes que nous venons d'exposer applicables aux solutions pures de diiodotyrosine ne tiennent pas compte du fait que la monoiodotyrosine, présente dans les iodoprotéines artificielles et dont la désioduration s'effectue simultanément, fausse les résultats.

Nous nous sommes proposés de réaliser le dosage des trois acides aminés iodés par des techniques nouvelles basées sur des réactions colorées spécifiques de chacune dans des conditions expérimentales bien définies. Nous pouvions espérer que la mise en œuvre de propriétés particulières de ces corps et non plus seulement la présence d'halogène dans chacun, nous permettraient d'une part, de doser la thyroxine avec plus de sécurité et, d'autre part, de déterminer les taux respectifs de diiodotyrosine et de monoiodotyrosine.

Les solutions chlorhydriques de nombreux o-diiodophénols se colorent en jaune orangé par addition de nitrite de sodium et virent au rouge après alcalinisation par l'ammoniaque. Cette réaction fortement positive avec la thyroxine et la diiodotyrosine (KENDALL et OSTERBERG [98], INGVALDSEN et CAMERON [89], HARINGTON [67]), est négative avec la monoiodotyrosine et la tyrosine (HARINGTON et PITT RIVERS [72]). Par ailleurs, ces deux dernières donnent la réaction dite de MILLON (coloration rouge en présence de sulfate mercurique et d'acide nitreux), tandis que tel n'est pas le cas pour les deux premières, dès lors il était légitime d'entreprendre des recherches sur l'application de ces réactions aux dosages des divers acides aminés iodés et tel est l'objet de ce travail. Au cours de celui-ci nous avons mis en œuvre la réaction aux ions nitreux pour le dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine, après séparation de ces corps au moyen de leurs différences de solubilité dans le butanol à divers pH , et la réaction de MILLON pour le dosage de la monoiodotyrosine.

Nous exposerons successivement l'étude du dosage des acides aminés iodés en solution pure, dans leurs mélanges, et dans les protéines thyroïdiennes ou iodées par voie chimique.

RECHERCHES PERSONNELLES.

I. — Dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine en solution pure et dans leur mélange en présence d'autres acides aminés.

Il convenait tout d'abord d'étudier la réaction colorée de la thyroxine et de la diiodotyrosine aux ions nitreux en vue de son adaptation au dosage de ces corps à l'état pur, comme l'ont envisagé indépendamment de nous MORTON et CHAIKOFF [138]. Nous avons recherché par la suite dans quelle mesure cette réaction est spécifique des deux acides aminés iodés en présence d'autres non halogénés. Enfin, nous avons appliqué le dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine pures à leur mélange après avoir réalisé le fractionnement de ce dernier.

1. ETUDE DE LA RÉACTION COLORÉE DE LA THYROXINE ET DE LA DIIODOTYROSINE ET DOSAGE DE CES CORPS A L'ÉTAT PUR.

Les solutions chlorhydriques de thyroxine ou de diiodotyrosine (*) additionnées de nitrite de sodium se colorent en jaune et virent ensuite à l'orangé par ébullition, puis au rouge brun par alcalinisation à l'ammoniaque. Après divers essais, nous avons éliminé la teinte brune apparaissant irrégulièrement dans le dernier temps de la réaction et sensibilisé celle-ci en opérant dans des conditions particulières. Les réactifs nécessaires sont (**):

Solution I : (a) Dissoudre 2,50 Mg de diiodotyrosine dans 10 cm³ NaOH 10 N, ajouter 25 cm³ H₂O puis 10 ml HCl 10,5 N et H₂O q. s. p. 50 cm³. (b) Dissoudre 5,00 Mg de thyroxine dans 20 cm³ NaOH 0,1 N.

Solution II : (a) Ajouter à 10 cm³ NaOH 10 N, 10 cm³ HCl 10,5 N et H₂O q. s. p. 50 cm³. (b) Mélanger 14,3 cm³ NaOH 10 N avec 14,3 cm³ HCl 10,5 N et compléter à 50 cm³ avec H₂O.

Solution III : Solution à 1 p. 100 de nitrite de sodium fraîchement préparée.

Ammoniaque concentrée (20 p. 100 NH₃).

Ethanol à 95°.

Le mode opératoire est le suivant : on place dans un tube à

(*) La DL-thyroxine et la L-diiodotyrosine employées pour ce travail présentaient les teneurs en iode suivantes : thyroxine, I p. 100 théorique = 65,35, trouvé = 65,05 ; diiodotyrosine, I p. 100 théorique = 58,63, trouvé = 58,30. Nous remercions la Maison Hoffmann-Laroche de nous avoir fourni ces produits.

(**) Les réactifs (a) sont particuliers à la diiodotyrosine, (b) à la thyroxine.

centrifuger conique une prise d'essai de solution I (5 cm³ au plus) renfermant 100 à 300 µg de thyroxine (Ib) ou 50 à 200 µg de diiodotyrosine (Ia) et l'on complète en cas de besoin à 5 cm³ avec de la solution II (a ou b selon l'emploi de solution Ia ou b). On ajoute 2,5 cm³ d'alcool à 95° puis, après agitation, 1 cm³ de solution III. Il se développe alors une coloration jaune atteignant son maximum d'intensité en 10 minutes à la température du laboratoire. Ce temps écoulé, on ajoute 1,50 cm³ d'ammoniaque concentrée et l'on mélange. Le milieu prend une teinte rouge, stable pendant 15 à 20 minutes. On centrifuge le fin précipité salin prenant naissance et l'on mesure l'intensité de la coloration au photomètre de PULFRICH, sous 2 cm d'épaisseur et en lumière filtrée par l'écran S₅₀.

La réaction est plus intense avec la diiodotyrosine qu'avec la thyroxine. Elle est sensibilisée par le chlorure de sodium, elle est plus ou moins forte selon l'acidité du milieu et la concentration de celui-ci en acide nitreux.

Les conditions que nous venons de mentionner sont les plus favorables tant en ce qui concerne la concentration des réactifs utilisés que les temps nécessaires à leur action. Elles ont été établies après de nombreux essais dans lesquels nous avons fait varier ces différents facteurs.

Il est donc indispensable d'opérer dans des conditions toujours identiques pour réaliser des mesures photométriques comparables entre elles. Le tableau I indique l'intensité de la coloration apparaissant en présence de 50 à 200 µg de diiodotyrosine ou de 100 à 300 µg de thyroxine dans les essais réalisés selon le mode opératoire choisi.

TABLEAU I.

*Intensité de la réaction colorée de la thyroxine
et de la diiodotyrosine aux ions nitreux.*

(Filtre S₅₀ 2 cm).

µg de thyroxine	Coefficient d'absorption (S ₅₀)	µg de diiodotyrosine	Coefficient d'absorption (S ₅₀)
121	0,20	50	0,12
169	0,25	61	0,14
181	0,28	92	0,20
226	0,34	100	0,22
241	0,36	122	0,25
282	0,43	150	0,32
301	0,45	200	0,41

Dans les limites de 100 à 300 μg pour la thyroxine et de 50 à 200 μg pour la diiodotyrosine la réaction suit la loi de BEER-LAMBERT, l'intensité des colorations obtenues étant alors proportionnelle aux quantités d'acide aminé. Il en découle que l'on peut doser l'un et l'autre des deux corps en solution pure en appliquant la technique décrite plus haut et en se référant à des courbes d'étalonnage établies sur des quantités connues de chacun.

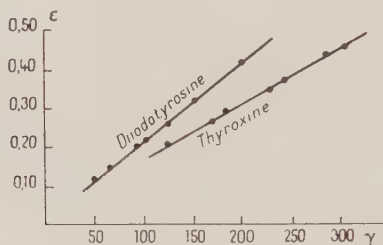


FIG. 1. — Courbe d'étalonnage de la réaction colorée de la thyroxine et de la diiodotyrosine (cuve de 2 cm écran S_{50}). Abscisses : μg de thyroxine ou de diiodotyrosine ; ordonnées : coefficient d'absorption.

Les données rapportées ci-dessus ont été utilisées pour élaborer deux courbes de ce type reproduites sur la figure 1.

2. SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION.

Comme l'ont signalé HARINGTON et PITT RIVERS [72], la monoiodyrosine ne donne pas de réaction colorée en présence d'ions nitreux (essais poursuivis sur 100 à 400 μg (*)). Il en est de même de l'acide glutamique, du glycofolle, de l'histidine, de la méthionine, de la phénylalanine, de la proline et de la sérine (5 Mg), de l'arginine et de la leucine (10 Mg). Par contre, il se développe une teinte jaune en présence de tryptophane ou de tyrosine et une réaction rouge dans les solutions de dioxyphénylalanine additionnées de nitrite de sodium dans les conditions définies plus haut. Le dernier de ces acides aminés

(*) Nos observations confirment à cet égard celles d'HARINGTON et PITT RIVERS [72] et sont, comme les leurs, en contradiction avec celles faites par LUDWIG et MUTZENBECHER [115] et par HERRIOTT [85] sur un produit isolé par ces derniers d'hydrolysats de protéines artificiellement iodées. Il est possible que ces divergences soient dues à la présence de diiodotyrosine dans les préparations d'HERRIOTT et de LUDWIG et MUTZENBECHER alors que tel n'est pas le cas dans celles de 3-monoiodyrosine de synthèse utilisées par HARINGTON et PITT RIVERS comme par nous. Nous remercions très vivement M. le Professeur HARINGTON d'avoir mis à notre disposition l'échantillon de 3-monoiodyrosine de synthèse (I p. 100 théorique = 42,10, trouvé = 41,35) sur lequel nos recherches ont été poursuivies.

étant absent des hydrolysats protéiques, on ne saurait en attendre de perturbation dans l'application de la méthode à ces milieux. Quant au tryptophane et à la tyrosine, l'intensité de leur réaction est illustrée par les données rassemblées dans le tableau II, déterminées par le mode opératoire adopté pour le dosage des acides aminés iodés en solution pure.

TABLEAU II.
*Intensité de la réaction colorée du tryptophane
et de la tyrosine aux ions nitreux.*
(Filtre S₅₀, 2 cm).

Mg de tryptophane	Coefficient d'absorption (S ₅₀)	Mg de tyrosine	Coefficient d'absorption (S ₅₀)
0,50	0,01	0,50	0,015
1,00	0,01	1,00	0,025
3,00	0,03	1,50	0,08
5,00	0,05	5,00	0,19

La coloration due à 1 Mg de tryptophane est donc négligeable, tandis que celle se manifestant en présence de tyrosine devra nécessairement être retenue lors du dosage des acides aminés iodés dans les protéines.

3. DOSAGE DE LA THYROXINE ET DE LA DIIODOTYROSINE DANS LEURS MÉLANGES.

Le dosage des deux acides aminés iodés décrit plus haut comporte une précision de ± 3 p. 100 sur les solutions pures de chacun, mais son intérêt serait très limité s'il ne pouvait pas être appliqué à des mélanges de ces corps. Or, les travaux d'HARINGTON et RANDALL [75], de LELAND et FOSTER [107], de BLAU [20, 21], ont précisé les conditions dans lesquelles ceux-ci peuvent être séparés quantitativement grâce à leurs différences de solubilité dans le butanol. L'extraction par ce dernier de milieux sodiques (NaOH 2 N) entraîne la thyroxine dans la phase alcoolique, la diiodotyrosine demeurant alors dans la phase aqueuse. Nous réservant de décrire par la suite en détail le mode opératoire adopté pour fractionner les acides aminés iodés dans les hydrolysats protéiques, nous nous bornerons à signaler ici que les quantités de chacun mises en expérience ont été retrouvées à ± 2 p. 100 près. Il est donc possible de doser la thyroxine et la diiodotyrosine dans leurs mélanges à l'aide de la méthode colorimétrique établie sur les solutions

pures de ces corps, grâce à leur séparation quantitative par extraction de la thyroxine au butanol.

II. — Dosage de la moniodotyrosine en solution pure et en présence de divers acides aminés.

Le dosage de la tyrosine a été basé par de nombreux auteurs sur la réaction dite de Millon, commune à de multiples phénols (coloration rouge orangé en présence de sulfate mercurique et d'ion nitreux). Cette réaction se manifeste dans les solutions de moniodotyrosine, mais non dans celles de diiodotyrosine ou de thyroxine ; aussi pouvait-on espérer doser le premier de ces corps en solution pure à l'aide d'une méthode élaborée antérieurement pour doser la tyrosine. Par ailleurs, les caractères spectraux des dérivés colorés des deux acides aminés présentant de sensibles différences, nous avons mis ces dernières à profit pour doser la moniodotyrosine en présence de tyrosine.

1. APPLICATION A LA MONIODOTYROSINE DU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA TYROSINE (LUGG).

Nous avons appliqué à des solutions titrées de 3-moniodotyrosine pure (HARINGTON et PITT RIVERS) le dosage de la tyrosine décrit par LUGG [118], dont nous rappellerons le mode opératoire.

Les réactifs nécessaires sont :

Solution I : solution de moniodotyrosine à 0,05 p. 100 dans SO_4H_2 0,7 N, fraîchement préparée.

Solution II : dissoudre dans 770 cm^3 H_2O additionnés de 79 cm^3 SO_4H_2 concentré 75 g SO_4Hg purifié, 55 g HgCl_2 70 g SO_4Na_2 et compléter à 1000 cm^3 avec H_2O .

Solution III : solution II diluée au demi par SO_4H_2 N.

Solution IV : solution de nitrite de sodium à 6,9 p. 100 fraîchement préparée.

La technique du dosage est la suivante : on place dans un tube à essai en verre pyrex un volume de solution I égal au plus à 5 cm^3 et renfermant de 0,5 à 2,5 Mg de moniodotyrosine et l'on complète à 5 cm^3 , si besoin est, par SO_4H_2 0,7 N. Après avoir ajouté 5 cm^3 de solution II on porte pendant 30 minutes au bain-marie à 60°, on refroidit sous un courant d'eau, on complète à 25 cm^3 avec de la solution III, puis on ajoute 0,5 cm^3 de solution IV. Il se développe alors une coloration rouge. Après agitation et, s'il y a lieu, centrifugation des fines particules de composés mercuriques en suspension,

on mesure l'intensité de l'absorption, dans les quinze minutes, au photomètre de PULFRICH (cuve de 2 cm, lumière filtrée par l'écran S₅₀). On trouvera dans le tableau III un exemple des résultats obtenus entre 0,48 et 2,63 Mg de produit.

TABLEAU III.

Intensité de la réaction de MILLON donnée par la 3-monoiodotyrosine (Filtre S₅₀, 2 cm).

Mg de monoiodotyrosine mis en expérience	Coefficient d'absorption (S ₅₀)
0,48	0,20
0,75	0,30
0,97	0,38
1,23	0,50
1,50	0,59
2,63	1,04

Ces données s'ordonnent suivant une droite passant pratiquement par l'origine, laquelle constitue la courbe d'étalonnage de la réaction de MILLON en présence de monoiodotyrosine dans les conditions opératoires adoptées. Il suffit d'y reporter la valeur expérimentale du coefficient d'absorption déterminée sur une prise d'essai pour connaître la quantité de l'acide aminé qu'elle renferme. La précision des résultats est égale à ± 2 p. 100 sur 0,50 à 2,80 Mg de monoiodotyrosine.

2. ETUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE LA RÉACTION DE MILLON EN PRÉSENCE DE TYROSINE ET DE MONOIODOTYROSINE ET DOSAGE DE CES ACIDES AMINÉS DANS LEUR MÉLANGE.

La réaction de MILLON n'est pas identique en présence de tyrosine et de monoiodotyrosine ; elle est rouge orangé avec la première et rouge carmin avec la seconde et, par ailleurs, son intensité est nettement plus forte dans le cas de la tyrosine. Aussi l'étude de l'absorption quantitative des produits colorés dérivant des deux acides aminés était-elle susceptible de comporter des applications analytiques.

Le spectre des solutions 10⁻² millimoléculaire de tyrosine et de 3-monoiodotyrosine traitées dans les conditions de leur dosage par la méthode de LUGG présente les caractères que traduisent les données numériques suivantes, à partir desquelles la figure 2 a été établie (voir tableau IV).

L'absorption des solutions de monoiodotyrosine est maximum au voisinage de 5200 Å, alors que celle des solutions de

TABLEAU IV.

Absorption des produits de la réaction de MILLON opérée sur la 3-monoiodotyrosine et sur la tyrosine pures.

Longueur d'onde (en unités Angstrom)	Coefficient d'absorption pour une concentration 1.10 ⁻² millimoléculaire sous 2 cm.	
	3-monoiodotyrosine	tyrosine
6400	0,105	0,036
6200	0,195	0,117
6000	0,277	0,255
5800	0,397	0,385
5600	0,518	0,560
5400	0,637	0,734
5300	0,660	0,865
5200	0,688	0,950
5100	0,684	1,008
5000	0,652	1,051
4900	—	1,056
4800	0,616	1,058
4600	0,457	0,945
4400	0,327	0,725
4200	0,254	0,523

tyrosine l'est à environ 4800 Å ; elle est par ailleurs beaucoup plus intense dans ces dernières. Aussi avons-nous cherché à doser les deux acides aminés dans leurs mélanges par des mesures du coefficient d'extinction de leurs solutions présentant la réaction de MILLON, opérées à deux longueurs d'onde différentes, comprises dans la région du spectre où chacun absorbe le plus fortement la lumière.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE.

La solution renfermant de la monoiodotyrosine et de la tyrosine est soumise à l'action des réactifs y provoquant le développement de la coloration (réaction de MILLON, technique de LUGG). On mesure ensuite l'absorption du milieu à deux longueurs d'onde voisines des sommets respectifs des bandes caractéristiques des dérivés de la monoiodotyrosine et de la tyrosine (fig. 2) au moyen du photomètre de PULFRICH. Les positions approchées des maxima étant respectivement 5200 Å pour la monoiodotyrosine et 4800 Å pour la tyrosine, on procède à deux mesures successives en lumière filtrée par les écrans S₅₃ et S₄₇, sélectifs au voisinage de ces deux longueurs d'onde. Soient M et m les valeurs du coefficient d'extinction d'un mélange inconnu établies sous une épaisseur

donnée (2 cm dans nos essais). On détermine par ailleurs dans les mêmes conditions celles propres à des solutions isomoléculaires de monoiodotyrosine et de tyrosine pures renfermant

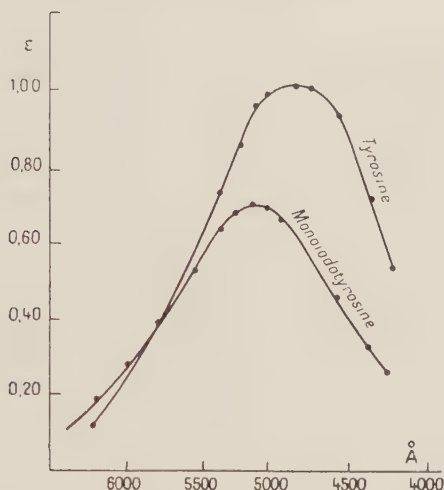


Fig. 2. — Spectre d'absorption des produits de la réaction de MILLON sur la monoiodotyrosine et sur la tyrosine pures. Abscisses : longueurs d'onde (Å). Ordonnées : coefficient d'absorption (ϵ) des solutions 1.10^{-2} mM sous 2 cm d'épaisseur.

une quantité connue C de chacun. Soient T et t d'une part, I et i d'autre part les coefficients d'absorption des quantités C de monoiodotyrosine et de tyrosine en lumières filtrées par les écrans S_{53} et S_{47} . Les quantités x de monoiodotyrosine et y de tyrosine présentes dans le mélange initialement étudié peuvent être calculées à partir des équations :

$$(1) M = \frac{I}{C} \cdot x + \frac{T}{C} \cdot y \text{ et } (2) m = \frac{i}{C} \cdot x + \frac{t}{C} \cdot y$$

Or, l'intensité de la réaction de MILLON donnée par les deux acides aminés purs suit la loi de BEER-LAMBERT entre des valeurs de C allant de $0,15$ à $0,90 \cdot 10^{-2}$ mM pour la monoiodotyrosine et de $0,12$ à $0,60 \cdot 10^{-2}$ mM pour la tyrosine, comme en témoignent les données du Tableau V.

Des courbes d'étalonnage de la réaction colorée des deux acides aminés en lumière filtrée par les écrans S_{53} et S_{47} peuvent être établies à partir de ces valeurs. Comme le montre l'examen de la figure 3, elles sont constituées par des droites pratiquement convergentes vers l'origine et se prêtent à une

TABLEAU V.

Intensité de la réaction de MILLON donnée par la 3-monoiodotyrosine et la tyrosine, mesurée en lumière filtrée par les écrans S_{53} et S_{47} (2 cm).

Quantité de monoiodotyrosine C (1.10^{-2} mM)	Coefficient d'absorption (ε) avec filtre	
	S_{53}	S_{47}
0,156	0,21	0,15
0,244	0,31	0,215
0,316	0,40	0,285
0,401	0,515	0,37
0,488	0,62	0,44
0,856	1,08	0,77
Quantité de tyrosine C (1.10^{-2} mM)	Coefficient d'adsorption (ε) avec filtre	
	S_{53}	S_{47}
0,116	0,235	0,27
0,232	0,44	0,50
0,348	0,66	0,73
0,464	0,85	0,97
0,487	0,91	1,02
0,580	1,08	1,22

détermination d' ε par extrapolation pour une concentration 1.10^{-2} mM des deux corps. Les valeurs d' ε ainsi obtenues sont

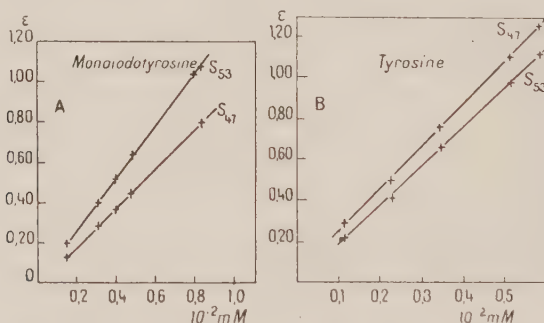


Fig. 3. — Courbes d'étalonnage de la réaction de MILLON de la 3-monoiodotyrosine (A) et de la tyrosine (B) en lumières filtrées par les écrans S_{53} et S_{47} du photomètre de PULFRICH (cuve de 2 cm). Abscisses : concentration en acide aminé (en 1.10^{-2} mM). Ordonnées : coefficient d'absorption (ε).

respectivement : pour la monoiodotyrosine 1,25 et 0,90 avec les filtres S_{53} et S_{47} , pour la tyrosine 1,84 et 2,10 pour les mêmes écrans. Les rapports $\frac{I}{C}$, $\frac{i}{C}$, $\frac{T}{C}$ et $\frac{t}{C}$ définissent les coefficients angulaires des courbes d'étalonnage ; aussi l'intro-

duction de leurs valeurs dans les équations précédentes permet-elle de calculer x et y connaissant M et m, soit :

$x = \frac{2,10 M - 1,84 m}{0,97}$ en 10^{-2} millimolécules de monoiodotyrosine, donc x.3,07 en milligrammes de ce produit, et

$y = \frac{1,25 m - 0,90 M}{0,97}$ en 10^{-2} millimolécules de tyrosine, donc y.1,81 milligrammes de celle-ci.

4. MODE OPÉRATOIRE ET RÉSULTATS.

Les opérations sont conduites comme pour le dosage de la monoiodotyrosine ou de la tyrosine pures, selon la technique de LUGG décrite plus haut. La précision la plus grande est obtenue lorsque les deux lectures qu'il convient de faire avec les filtres S_{53} et S_{47} correspondent à des valeurs d' ϵ comprises entre 0,8 et 1,1. On trouvera dans le tableau VI trois exemples de résultats obtenus sur des mélanges des deux acides aminés.

TABLEAU VI.

Exemples de dosage de monoiodotyrosine et de tyrosine dans des mélanges de ces corps.

Constituant du mélange dosé	Quantité (10^{-2} mM)			Lu avec le filtre	
	théorique	retrouvée	Erreur p. 100	S_{53}	S_{47}
A) Monoiodotyrosine.	0,039	0,041	+ 5,1	0,89	1,00
Tyrosine	0,414	0,432	+ 4,3		
B) Monoiodotyrosine.	0,255	0,278	+ 6,3	0,79	0,75
Tyrosine	0,258	0,240	— 6,9		
C) Monoiodotyrosine.	0,593	0,609	+ 2,6	0,95	0,76
Tyrosine	0,102	0,098	— 3,9		

La méthode est applicable à des prises d'essai renfermant de 0,25 à 1,00 Mg de tyrosine et de 0,50 à 2,00 Mg de monoiodotyrosine avec une erreur relative moyenne de ± 5 p. 100. Les données citées montrent que cette dernière est d'autant plus grande que l'écart entre les lectures faites avec les écrans S_{53} et S_{47} est moins important. Par ailleurs, on ne saurait espérer doser par ce procédé de très faibles quantités de l'un des acides aminés en présence d'un fort excès de l'autre et il convient que le mélange renferme au moins 5 p. 100 de celui dont il est le plus pauvre. En pratique, il y a intérêt à faire un premier dosage d'orientation, sur une prise d'essai renfermant

environ $0,2 \cdot 10^{-2}$ millimolécule du mélange afin d'obtenir un résultat approximatif, puis de réaliser un second dosage sur $0,6$ à $0,7 \cdot 10^{-2}$ millimolécule si le milieu est beaucoup plus riche en monoiodotyrosine qu'en tyrosine, ou sur $0,4$ à $0,5 \cdot 10^{-2}$ millimolécule dans le cas inverse.

III. — Dosage de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine dans les iodoprotéines naturelles ou artificielles.

L'application aux protéines des méthodes établies sur les solutions des acides aminés ne pouvait être faite sans une étude préalable indispensable à sa justification. Les travaux antérieurs renferment à cet égard des indications très utiles, surtout en ce qui concerne le dosage de la thyroxine, car la diiodotyrosine n'a été dosée jusqu'ici que par voie indirecte et la monoiodotyrosine ne l'a pas encore été. De ce fait, le dosage des deux derniers corps posait des problèmes plus étendus. En outre, il y avait lieu de préciser si un même mode opératoire peut être adopté pour les protéines thyroïdiennes et pour les iodoprotéines artificielles, car la composition des unes et des autres présente de notables différences. Les premières renferment de petites quantités de thyroxine et de diiodotyrosine, mais sont probablement dépourvues d'autres acides aminés iodés, tandis que l'on rencontre dans les hydrolysats des secondes de la thyroxine, de la diiodotyrosine, de la monoiodotyrosine et les dérivés halogénés de l'histidine. Nous examinerons successivement les recherches poursuivies sur les deux types de protéine.

A. — DOSAGE DE LA THYROXINE.

1. *Cas des protéines thyroïdiennes.*

Les travaux de BLAU [21], ont établi que l'hydrolyse de ces protéines par la baryte à 8 p. 100 au bain-marie bouillant pendant 6 heures libère quantitativement la thyroxine sans décomposition importante de celle-ci (perte de 2 à 3 p. 100 de l'iode à l'état d'iodure). Par ailleurs, LELAND et FOSTER [107] ont précisé les conditions dans lesquelles ce produit peut être séparé de la diiodotyrosine au moyen de son extraction par le butanol. Nous avons tout d'abord contrôlé que des solutions titrées de thyroxine additionnées de 8 p. 100 de baryte ne

renferment après chauffage de 6 heures au bain d'huile à 115-120° que 2 à 4 p. 100 de leur iode à l'état d'iodures ; 96 à 98 p. 100 de l'acide aminé sont alors retrouvés par la méthode colorimétrique décrite plus haut. Il en est de même de la thyroxine ajoutée à la thyroglobuline avant l'hydrolyse de celle-ci. Nous avons ensuite vérifié que l'extrait butanolique des hydrolysats porté à $pH = 3,5-4,0$ renferme la totalité de la thyroxine et que le lavage à la soude en élimine la diiodotyrosine. On n'y trouve plus alors que des quantités minimes de tyrosine (200 μg environ pour 100 Mg de thyroglobuline), trop faibles pour donner une réaction appréciable en présence d'ions nitreux et gêner le dosage. Les résultats de ces essais ont permis d'adopter la technique que nous proposons.

Réactifs nécessaires.

Solution I : mélanger 10 cm^3 NaOH 10 N, 10 cm^3 HCl 10,5 N, 25 cm^3 éthanol à 95° et 30 cm^3 H₂O (*).

Solution II : solution à 1 p. 100 de nitrite de sodium fraîchement préparée.

Ammoniaque concentrée (20 p. 100), NaOH 5 N, HCl N, Ba(OH)₂, 8 H₂O, butanol.

Mode opératoire. — 50 à 200 Mg de thyroglobuline ou de poudre de thyroïde (**) sont additionnés de 10 cm^3 H₂O et de 0,8 g Ba(OH)₂, 8 H₂O et portés pendant 6 heures au bain d'huile à 115-120° sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on transvase quantitativement dans une ampoule à décantation de 50 cm^3 . On amène le milieu à $pH = 3,5-4,0$ à l'aide d'HCl N (virage au bleu ardoisé du bleu de bromophénol) et l'on porte à 15 cm^3 avec de l'eau distillée. Après addition de 15 cm^3 de butanol on agite énergiquement et laisse reposer 12 heures ; la totalité de la thyroxine passe alors en solution dans le butanol avec une partie de la diiodotyrosine. Pour éliminer celle-ci, on lave l'extrait butanolique avec de la soude 5 N (deux lavages, le premier avec 15 cm^3 le second avec 7,5 cm^3) en ayant soin de ne pas éliminer les produits insolubles rassemblés à la limite de séparation des deux liquides. On centrifuge, puis on décante le butanol, que l'on évapore à l'étude à 70°. On reprend

(*) La composition de ce réactif répond à la nécessité d'une certaine concentration en chlorure de sodium pour le développement complet de la réaction colorée et à celle d'une certaine teneur en éthanol du milieu pour assurer la dissolution de la thyroxine dans les derniers temps du dosage.

(**) La quantité minima de produit qu'il convient de soumettre à l'hydrolyse est fonction de sa teneur en thyroxine, assez variable dans les thyroglobulines.

le résidu sec par 10 cm³ de la solution I et l'on dose la thyroxine sur une partie aliquote d'un volume égal ou inférieur à 7,5 cm³ et renfermant de 100 à 300 µg de ce corps.

Pour cela, on ajoute à l'échantillon prélevé autant de cm³ de solution I qu'il est nécessaire pour atteindre le volume total de 7,5 cm³, puis 1 cm³ de solution II. On abandonne à 15° pendant 10 minutes, au cours desquelles il se développe une coloration jaune orangé, puis on ajoute 1,5 cm³ d'ammoniaque concentrée, ce qui provoque un virage au rouge. On centrifuge et l'on mesure, dans les 15 minutes qui suivent l'alcalinisation, l'intensité de la coloration au photomètre de PULFRICH sous 2 cm d'épaisseur et en lumière filtrée par l'écran S₅₀. On reporte le résultat obtenu sur une courbe d'étalonnage établie au préalable en opérant de la même manière sur des solutions titrées de thyroxine (100 à 300 µg), ce qui permet de déterminer la quantité de ce corps présente dans la prise d'essai (*). Le tableau VII renferme des résultats obtenus sur deux hydrolysats d'une même thyroglobuline de bœuf, cités à titre d'exemple.

TABLEAU VII.

Exemple de dosage de la thyroxine dans une thyroglobuline de bœuf.

Quantité de protéine hydrolysée	Coefficient d'absorption (2 cm filtre S ₅₀)	Thyroxine p. 100
50 Mg	0,215	0,245
100 Mg	0,420	0,236
	témoin 0,025	

La méthode permet de doser la thyroxine à ± 4 p. 100 près dans 50 à 200 Mg de thyroglobuline et dans 100 à 300 Mg de poudre de thyroïde. Ses résultats sont identiques à ceux de la technique de BLAU, laquelle exige la mise en œuvre de quantités beaucoup plus grandes de produit (500 Mg au moins (**)).

2. Cas des protéines iodées.

Le dosage de la thyroxine dans les protéines artificiellement iodées présente des difficultés particulières en raison de la te-

(*) Il est recommandé, comme dans tous les dosages colorimétriques, de faire un essai témoin sur les réactifs mis en œuvre dans les conditions du dosage, et, s'il y a lieu, de soustraire la valeur de ϵ ainsi déterminée de celle obtenue en présence de l'hydrolysât protéique. Dans cet essai à blanc ϵ ne doit pas dépasser 0,03.

(**) Dans l'exemple cité plus haut, la thyroglobuline de bœuf étudiée renferme 0,243 p. 100 de thyroxine déterminée par la méthode de BLAU.

neur élevée de ces produits en autres dérivés iodés solubles dans le butanol. Ces derniers ne donnant pas la réaction colorée des o.diiodophénols, il apparaissait que l'application de notre méthode aux iodoprotéines artificielles pourrait être réalisée, une fois fixées les conditions d'hydrolyse à adopter. REINEKE, TURNER, KOHLER, HOOVER et BEEZLEY [172], ont proposé de doser la thyroxine dans les iodoprotéines en utilisant la méthode de BLAU sur des hydrolysats obtenus par action de la baryte à 40 p. 100 pendant 20 heures au bain-marie bouillant. Les pertes en thyroxine résultant de cette opération étant de 6 à 7 p. 100, nous avons préféré lui substituer l'hydrolyse par la baryte à 8 p. 100 au bain d'huile à 115-120° pendant 6 heures, laquelle ne libère que 2 à 4 p. 100 de l'iode sous forme d'iodure. Par ailleurs, l'étude parallèle de la teneur en iode total et en thyroxine — la première déterminée par la méthode de MICHEL et LAFON [135] et la seconde par colorimétrie — de l'extrait butanolique des hydrolysats préparé selon le mode opératoire de REINEKE et de ses collaborateurs a révélé de notables écarts, sur lesquels nous reviendrons plus loin. Aussi y a-t-il lieu de réaliser une purification de cet extrait, riche en dérivés iodés autres que la thyroxine.

C'est ainsi que la diiodohydroxybenzaldéhyde isolée par PITT RIVERS des hydrolysats alcalins de caséine iodée, soluble dans le butanol comme la thyroxine, entraîne une erreur par excès dans le dosage de celle-ci par la méthode des auteurs américains.

L'application à la diiodohydroxybenzaldéhyde de la réaction aux ions nitreux effectuées dans les conditions adoptées pour le dosage de la thyroxine en solution pure montre que 500 μ g du premier composé fournit une coloration correspondant à 25 μ g seulement du second de sorte que l'on peut négliger son influence.

Principe de la méthode. — La thyroxine, libérée de l'iodoprotéine par hydrolyse barytique, est extraite quantitativement par le butanol à pH = 3,5-4,0. Après lavage à la soude 5 N de la solution butanolique, dont la plus grande partie des dérivés iodée non-thyroxiniens est ainsi éliminée, on évapore le solvant à + 70°. Le résidu sec obtenu est repris dans de l'eau acidulée à pH = 3,5-4,0 par l'acide chlorhydrique et soumis à une nouvelle extraction par le butanol. Celui-ci est ensuite lavé à la soude 5 N et évaporé à + 70°, cette double extraction étant indispensable pour éliminer complètement la diiodotyro-

sine en excès. Après reprise du résidu sec par un milieu approprié, on opère sur une partie aliquote la réaction colorée de la thyroxine aux ions nitreux, dont on mesure l'intensité du photomètre de Pulfrich. On détermine sur une courbe d'éta-lonnage, établie au préalable sur une solution titrée de thy-roxine pure, la quantité de celle-ci présente dans la prise d'essai (*).

Mode opératoire. — 100 à 200 Mg de protéine iodée sont additionnées de 5 à 10 cm³ de solution (5 cm³ par 100 Mg) de Ba(OH)₂ à 8 p. 100 et chauffés pendant 6 heures au bain d'huile à 115-120° sous réfrigérant à reflux. Après refroidisse-ment, on transvase quantitativement dans une ampoule à dé-canter de 50 cm³. On amène le milieu à pH = 3,5-4,0 à l'aide d'HCl N (virage au bleu ardoisé du bleu de bromophénol) et l'on porte à 15 cm³ avec de l'eau distillée. On ajoute 15 cm³ de butanol et l'on agite énergiquement, puis on laisse reposer 12 heures ; la totalité de la thyroxine passe alors dans le bu-tanol avec une partie importante de la diiodotyrosine et d'au-tres dérivés iodés. Pour éliminer ces composés, dont le premier seul donne la même réaction colorée que la thyroxine, on lave l'extrait butanolique avec NaOH 5 N (2 lavages avec 15 cm³ et 1 avec 7,5 cm³ NaOH 5 N) en ayant soin de ne pas éliminer les produits insolubles rassemblés à la limite de séparation des deux liquides. On centrifuge, on décante le butanol que l'on évapore à l'étuve à 70°. Afin de se débarrasser complète-ment de la diiodotyrosine, on procède à une nouvelle extrac-tion au butanol du résidu sec de la première repris par 15 cm³ d'eau acidulée à pH = 3,5-4,0 par HCl N. Le produit de cette seconde extraction est traité comme celui de la première et évaporé à 70. Ceci fait, on dissout le résidu sec obtenu dans 15 cm³ de solution hydroalcoolique de chlorure de sodium (solu-tion I, voir page 33) et l'on dose la thyroxine sur une partie aliquote selon le mode opératoire décrit à propos des produits thyroïdiens.

Les résultats obtenus sont exacts à ± 4 p. 100 près, comme l'ont montré les essais réalisés sur de multiples hydrolysats d'une même préparation additionnés ou non de quantités con-nues de thyroxine.

(*) Il va de soi que l'on peut substituer au photomètre de Pulfrich un autre appareil de mesure en disposant d'un écran de même sélecti-vité que celui choisi par nous (S₉₀) ou que l'on peut opérer par colori-métrie directe en mettant en œuvre une solution étalon de thyroxine.

Justification de la méthode. — Une double extraction au butanol réalisant une purification du premier extrait de l'hydrolysate est indispensable dans le cas des protéines artificiellement iodées, alors qu'elle est inutile dans celui des produits thyroïdiens. Il en est ainsi, en raison de leur teneur élevée des premières en diiodotyrosine (jusqu'à 9,3 p. 100 dans certains iodocaséines préparées en milieu ammoniacal) et en autres acides aminés iodés peu solubles dans le butanol. On trouvera ci-dessous les résultats d'une expérience particulièrement démonstrative.

Deux préparations d'iodocaséine renfermant respectivement 6,75 p. 100 d'iode (A) et 8,80 p. 100 I (B) ont été hydrolysées selon le mode opératoire décrit plus haut (baryte à 8 p. 100 ; six heures au bain de paraffine à + 115°). La solution obtenue a été divisée en trois parties égales, lesquelles ont été soumises à une extraction butanolique (extraction à $pH = 3,5-4,0$, lavages avec NaOH 5 N, évaporation à sec et remise en solution). On a répété une fois cette opération, le lavage et l'évaporation sur le résidu sec de l'un des trois essais, et deux fois sur celui du troisième. La thyroxine a été dosée dans les produits ainsi obtenus par colorimétrie et par dosage de l'iode total. Les valeurs déterminées par l'une et l'autre de ces méthodes sont les suivantes.

TABLEAU VIII.

Numéro de l'iodocaséine	Thyroxine p. 100 déterminée après					
	1 extraction		2 extractions		3 extractions	
	par colorimétrie	I total	par colorimétrie	I total	par colorimétrie	I total
A	2,16	2,90	1,45	1,40	1,45	1,38
B	2,65	3,67	1,56	1,61	1,46	1,57

La concordance entre les données déterminées par colorimétrie et par dosage de l'iode total dans le produit de la seconde extraction butanolique montre que, dans les conditions adoptées, la thyroxine est pratiquement le seul corps iodé présent. Par contre, l'écart entre les valeurs obtenues dans le résidu sec de la première extraction illustre l'existence dans celui-ci de dérivés iodés ne donnant pas la réaction colorée des o-diiodo-phénols ; celle-ci est alors plus intense que dans le produit

de deux extractions successives, car de la diiodotyrosine accompagnée encore la thyroxine et n'est éliminée par la suite que lors du second traitement butanolique.

On pouvait dès lors penser que la méthode de REINEKE, TURNER, HOOVER, BEEZLEY [172], laquelle ne comporte qu'une seule extraction au butanol après hydrolyse de vingt heures par la baryte à 40 p. 100 au bain-marie bouillant, donne des résultats trop élevés. Tel est le cas, comme le montrent les quelques données suivantes, citées à titre d'exemple.

Iodoprotéine étudiée	Thyroxine p. 100	
	Méthode colorimétrique	Méthode de Reineke
Iodocaséine (6,75 p. 100 I)... ..	1,45	1,72
Iodocaséine (8,08 p. 100 I).....	1,56	2,00
Iodothyroglobuline (1,41 p. 100 I).	0,23	0,44
Iodothyroglobuline (3,52 p. 100 I).	0,68	0,86

Les résultats de la méthode de REINEKE et de ses collaborateurs sont dans la plupart des cas, moins élevés que ceux obtenus sur les produits de l'hydrolyse barytique à 8 p. 100 (six heures au bain de paraffine à + 115°) soumis à une seule extraction butanolique. Il en est probablement ainsi parce que le mode opératoire des auteurs américains (hydrolyse par la baryte à 40 p. 100 à 100° C pendant vingt heures suivie d'une extraction au butanol) comporte deux facteurs de perturbation jouant en sens inverse, la destruction de la thyroxine au cours de l'hydrolyse « compensant » alors en partie la présence de produits iodés non-thyroxiniens dans l'extrait butanolique. L'identité des résultats fournis par la méthode de REINEKE et ses collaborateurs avec le titrage biologique de l'activité des produits sur les échanges respiratoires ne constitue pas un contrôle absolu des premiers. En effet, les teneurs en thyroxine déterminées par la méthode chimique des auteurs américains correspondent bien à celles obtenues par le dosage biologique étalonné par rapport à l'activité de la L-thyroxine pure sur le métabolisme du Cobaye. Or, par ailleurs, pour MEANS, LEHRMANN et SALTER [129], la thyroglobuline et divers peptides de thyroxine seraient à cet égard sensiblement plus actifs que l'acide aminé lui-même. Aussi, la concordance observée par REINEKE et ses collaborateurs exprime-t-elle probablement le fait que les données fournies par leur méthode sont trop élevées.

Elles sont en général supérieures de 15 à 25 p. 100 à celles déterminées par notre technique.

B. — DOSAGE DE LA DIIODOTYROSINE.

Le dosage que nous proposons s'applique aux protéines thyroïdiennes comme aux protéines artificiellement iodées ; aussi le mode opératoire décrit ne comporte-t-il pas de variantes, comme dans le cas de la thyroxine. Sa mise au point a exigé de nombreux essais, sur lesquels nous nous étendrons tout d'abord.

Justification des divers temps du dosage. — La première opération devant être réalisée est l'hydrolyse alcaline des protéines. En raison des différences de stabilité de la thyroxine et de la diiodotyrosine dans les milieux barytiques ou sodiques et de l'inégale solubilité dans le butanol des sels barytique et sodique de ces acides aminés, l'hydrolyse par la baryte peut légitimement être retenue pour le dosage du premier, mais celle par la soude permet seule un dosage correct du second. En effet, le thyroxinate de baryum est peu soluble dans le butanol et, par ailleurs, l'extraction des hydrolysats à $pH = 3,5-4,0$ entraîne de 60 à 80 p. 100 de la diiodotyrosine en même temps que la totalité de la thyroxine. Nous avons adopté une hydrolyse de 8 heures par la soude 5N au bain d'huile à $115-120^{\circ}$, classiquement employée pour libérer la tyrosine des protéines non iodées. Les données du tableau IX, établies sur des solutions de diiodotyrosine pure, en justifient l'usage.

TABLEAU IX.

..Stabilité de la diiodotyrosine dans NaOH 5N au bain d'huile à 115° .

Temps de chauffage (heures et minutes)	Quantité de diiodotyrosine		Ecart p. 100
	mise en œuvre µg	retrouvée colorimétrie µg	
4,00	190	196	+ 2,9
5,50	190	184	— 3,1
8,00	80	84	+ 1,2
8,00	206	202	— 2,0
14,00	79	68	—13,9
18,30	206	162	—21,3

Il convient, l'hydrolyse achevée, d'éliminer la thyroxine, car elle donne la même réaction colorée que la diiodotyrosine en

présence d'ions nitreux. La solubilité dans le butanol du sel sodique de la première permet ce fractionnement (LELAND et FOSTER, BLAU). Comme nous nous en sommes assurés, la thyroxine est aussi efficacement éliminée d'un mélange des deux acides aminés purs que d'un hydrolysât protéique par l'extraction butanolique d'une solution sodique. De plus, les produits de sa dégradation pouvant se former au cours de l'hydrolyse alcaline n'interviennent pas dans le dosage, car ils sont ou solubles comme elle dans le butanol ou non-chromogènes en présence d'ions nitreux.

Par contre, d'autres acides aminés sont alors susceptibles de gêner et il convient ou de les éliminer, ou de tenir compte de leur présence en introduisant un facteur de correction.

Deux observations sont à retenir dans ce domaine. Comme nous l'avons déjà signalé, le tryptophane et la tyrosine donnent naissance à des pigments jaunes dans les conditions où l'on se place pour opérer la réaction de la diiodotyrosine au nitrite de sodium. Néanmoins, la coloration due au tryptophane est si faible qu'elle ne gêne pas les mesures si la prise d'essai renferme moins de 2 Mg de celui-ci. C'est là une condition très facile à réaliser en pratique, les thyroglobulines renfermant de 2,0 à 2,3 p. 100 de cet acide aminé et les iodo-protéines artificielles étant d'une teneur en diiodotyrosine toujours assez élevée pour que l'on puisse opérer sur des quantités très faibles. Il n'en est pas de même de la réaction de la tyrosine, environ 80 fois moins intense que celle de son dérivé diiodé (filtre S_{50}), mais non négligeable, surtout dans les thyroglobulines, renfermant en général 3,2 p. 100 de tyrosine et environ 0,4 p. 100 du dérivé diiodé. L'expérience a montré que l'absorption des pigments provenant des deux acides aminés suit la loi de BEER-LAMBERT entre 50 et 200 μ g de diiodotyrosine et 0,5 et 4,0 Mg de tyrosine. Par ailleurs, elle est égale à la somme de celles propres à chaque constituant dans le mélange des deux corps. Ceci étant, on peut doser la diiodotyrosine en présence de tyrosine en se reportant à un système de deux courbes d'étalonnage dont un exemple, correspondant aux valeurs expérimentales citées (page 25) est reproduit sur la fig. 4. Il suffit pour cela de soustraire de la valeur d' ε lue au photomètre PULFRICH (filtre S_{50} , cuve de 2 cm) lors du dosage d'un mélange, de celle d' ε correspondant à la quantité de tyrosine présente dans la prise d'essai. Cette dernière valeur est déterminée par extrapolation sur une

courbe d'étalonnage établie sur l'acide aminé pur, la quantité de tyrosine présente étant au préalable dosée par la méthode

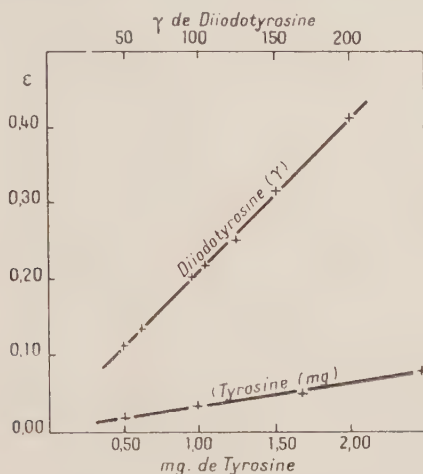


Fig. 4. — Courbes d'étalonnage de la réaction colorée de la diiodotyrosine et de la tyrosine (écran S_{50} , 2 cm d'épaisseur). Abscisses : μ g de diiodotyrosine et mg de tyrosine. Ordonnées : coefficient d'absorption (ϵ).

de BERNHART [19]. Quelques exemples justifiant ce mode opératoire ont été rassemblés dans le tableau X.

TABLEAU X.

Intensité de la réaction colorée de la tyrosine aux ions nitreux dans les hydrolysats de diverses protéines (filtre S_{50} 2 cm.).

Quantité et nature de la protéine hydrolysée	Mg de tyrosine présents (méthode de Bernhardt)	Valeurs de ϵ	
		déterminée par réaction aux ions NO_2	calculée à partir du taux de tyrosine
40 Mg caséine (*).	1,64	0,07	0,06
70 Mg caséine ...	2,87	0,09	0,095
100 Mg caséine ...	4,10	0,13	0,135
50 Mg fibrine ...	2,45	0,08	0,075
40 Mg gélatine...	traces indos.	0,00	0,00
70 Mg gélatine...	traces indos.	0,00	0,00
100 Mg gélatine...	traces indos.	0,01	0,00

(*) Caséine brute, non desséchée, renfermant 12,2 p. 100 N.

Une seconde difficulté a été rencontrée dans l'application du dosage de la diiodotyrosine aux protéines. La faible teneur

des produits thyroïdiens en ce dérivé rend inéluctable la nécessité de le doser en présence de quantités importantes d'autres acides aminés. Il était possible que ceux-ci faussent les résultats même s'ils ne se colorent pas sous l'influence des réactifs. Tel est en effet le cas, comme en rend compte l'examen des quelques exemples résumés dans le tableau XI.

TABLEAU XI.

Influence d'un excès d'acides aminés divers sur la réaction colorée de la diiodotyrosine aux ions nitreux (Filtre S₂₀ 2 cm.).

Quantité de diiodotyrosine en expérience (μg)	Quantité (Mg) et nature du produit ajouté	Quantité de diiodotyrosine retrouvée (μg)	Erreur p. 100
103	33 Mg glycocolle	103	0
103	100 Mg —	83	— 19,4
187	33 Mg —	184	— 1,6
187	66 Mg —	178	— 4,8
187	100 Mg —	164	— 12,2
187	100 Mg histidine	185	— 1,0
187	100 Mg phénylalanine	172	— 8,5
95	50 Mg caséine hydrolysée	96	+ 1,0
96	100 Mg — —	72	— 25,1
200	50 Mg — —	203	+ 1,5
200	100 Mg — —	162	— 18,0

(*) Compte tenu de la tyrosine présente dans les hydrolysats de caséine.

Un excès de certains acides aminés gêne donc le dosage sans donner lieu à une réaction colorée, probablement en réagissant avec les ions nitreux par leur radical aminé, ce qui provoque la destruction d'une partie de ces ions (*). Les faits observés limitent à 50 Mg environ la quantité d'acides aminés en présence de laquelle il est possible d'opérer ; la méthode est donc directement applicable à toutes les protéines renfermant plus de 0,1 p. 100 de diiodotyrosine, c'est-à-dire aux produits thyroïdiens normaux et aux iodoprotéines artificielles. On peut néanmoins doser la diiodotyrosine dans les thyroglobulines pathologiques exceptionnellement pauvres en iode en ajoutant à leur hydrolysate une quantité connue de l'acide aminé, dont on tient compte dans le calcul des résultats. L'ensemble de

(*) Les produits de dégradation des acides aminés se formant en milieu alcalin, entre autres l'ammoniaque, les sulfures, les iodures, l'urée, ne modifient pas l'intensité de la réaction aux taux où ils sont présents dans les hydrolysats.

ces observations a permis d'adopter la technique suivante, laquelle comporte le dosage sur un même hydrolysât de la somme : diiodotyrosine et tyrosine (réaction aux ions nitreux) et de la tyrosine (méthode de BERNHART) (*) et le calcul, par différence, de la teneur en diiodotyrosine.

Réactifs nécessaires. — On doit disposer des réactifs destinés aux dosages de la diiodotyrosine et de la tyrosine. Les premiers sont :

Solution I : ajouter à 10 cm³ NaOH 10 N, 10 cm³ HCl 10,5 N et H₂O q.s.p. 50 cm³.

Solution II : solution de nitrite de sodium à 1 p. 100 fraîchement préparée.

NaOH 5 N ; NaOH 10 N ; HCl pur (d = 1,19, titrant 10,5 N) ; éthanol à 95° ; n-Butanol, Ammoniaque concentrée.

Les seconds sont :

Solution A : dissoudre 15 g SO₄Hg purifié dans 95 cm³ SO₄H₂ 5 N, filtrer sur verre fritté et compléter à 100 cm³ avec SO₄H₂ 5 N.

Solution B : solution de nitrite de sodium à 1 p. 100 fraîchement préparée.

SO₄H₂ 7 N ; SO₄H₂ 0,5 N.

Mode opératoire. — 100 Mg de protéine sont chauffés pendant 8 heures au bain d'huile à 115-120° en présence de 2,0 cm³ NaOH 5 N sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on transvase dans un tube à centrifuger conique de 16 cm³ portant un trait de jauge correspondant à un volume de 7,5 cm³. On ajoute 2 cm³ NaOH 10 N et, après avoir complété à 7,5 cm³ avec de l'eau distillée, on ajoute 7,5 cm³ de butanol. On agite énergiquement tous les quarts d'heure pendant 2 heures, on centrifuge et l'on siphonne le butanol surnageant, lequel renferme la thyroxine. On transvase la couche aqueuse dans un ballon jaugé de 15 cm³, on ajoute 3 cm³ HCl concentré et l'on complète à 15 cm³ avec de l'eau distillée. On prélève une partie aliquote (2 à 4 cm³) renfermant de 50 à 200 µg de diiodotyrosine, à laquelle on ajoute le nombre de cm³ de solution I nécessaire pour la porter à 5 cm³, puis 2,5 cm³ d'éthanol à 95° et 1 cm³ de solution II. On abandonne pendant 10 minutes, au cours desquelles il se développe une coloration jaune orangé. On ajoute ensuite 1,5 cm³ d'ammoniaque à 20 p. 100, ce qui provoque un virage au rouge. On centrifuge et l'on détermine, dans les 15 minutes qui suivent l'alcalinisation du

(*) La méthode de BERNHART, bien que sensiblement moins précise que celle de LUGG convient pour ce dosage. Elle est très rapide, d'exécution très simple, et permet d'opérer sur des quantités minimales de produit (50 à 200 µg de tyrosine).

milieu, l'intensité de l'absorption au photomètre de PULFRICH (filtre S_{50} cuve de 2 cm). Soit α la valeur obtenue.

La tyrosine est dosée sur une partie de l'hydrolysats renfermant de 50 à 200 μg de cet acide aminé. Pour cela, on place dans un tube à centrifuger de 10 cm^3 , 1 ou 2 cm^3 de ce milieu acidifié à 0,5 N par SO_4H_2 et, si besoin est, on complète à 2 cm^3 par SO_4H_2 0,5 N. On ajoute 1,5 ml de solution A. On porte 10 minutes au bain-marie bouillant et, après refroidissement, on ajoute dans l'ordre, 1 cm^3 SO_4H_2 7 N et 1 cm^3 de réactif B. Il se forme en la présence du premier un précipité dans lequel le tryptophane est entraîné à l'état de dérivé mercurique, tandis que la combinaison mercurique de la tyrosine demeure en solution et donne par la suite la réaction de MILLON. Après centrifugation, on mesure au photomètre de PULFRICH (filtre S_{50} cuve de 2 cm) l'intensité de celle-ci dans les 15 minutes et l'on repère sur la courbe d'étalonnage de la méthode de BERNHART, établie au préalable sur des solutions titrées de tyrosine, la quantité de cet acide aminé présente dans la prise d'essai.

Connaissant la teneur en tyrosine de l'hydrolysats par unité de volume, on calcule celle accompagnant la diiodotyrosine dans l'échantillon mis en œuvre pour le dosage de celle-ci au premier temps des opérations. On détermine ensuite l'absorption due à cet acide aminé dans la prise d'essai en se reportant à la courbe d'étalonnage de la réaction colorée de la tyrosine en présence d'ions nitreux (fig. 4). Soit b la valeur obtenue. La quantité de diiodotyrosine est égale à la différence : $\alpha - b$.

La correction ainsi introduite dans le calcul des résultats pour éliminer l'erreur par excès due à la tyrosine est de 6 à 7 p. 100 dans le cas des protéines thyroïdiennes ; elle est moindre, souvent nulle, dans celui des protéines artificiellement iodées (*). En raison de la nécessité dans laquelle on se trouve de l'appliquer aux premières, la précision de la méthode ne dépasse pas alors ± 5 p. 100, tandis qu'elle atteint ± 3 p. 100 quand on la met en œuvre sur les secondes.

(*) Une fraction minime de la tyrosine étant extraite par le butanol en milieu alcalin, cette correction est théoriquement un peu trop forte ; en fait, elle est si minime que l'on peut à bon droit la considérer comme correcte. L'exactitude de cette manière de voir ressort de l'observation, citée plus haut, que de la diiodotyrosine ajoutée à des hydrolysats de caséine est retrouvée quantitativement en appliquant cette correction.

C. — DOSAGE DE LA MONOIODOTYROSINE.

La monoiodotyrosine est un constituant des protéines artificiellement iodées et les protéines thyroïdiennes en sont dépourvues, ou tout au moins si pauvres que cet acide aminé n'a pas pu y être mis en évidence ; aussi est-ce aux premières seules que s'applique son dosage.

Divers contrôles ont tout d'abord été institués pour choisir un agent d'hydrolyse. La monoiodotyrosine est décomposée avec libération d'iode et de tyrosine par SO_4H_2 8 N à l'ébullition. Elle ne subit par contre qu'une perte d'iode minime, ne dépassant pas 3 p. 100, lorsqu'elle est chauffée pendant 8 heures au bain d'huile à 115-120° dans de la soude 5 N. Par ailleurs, la tyrosine soumise à la même opération est quantitativement retrouvée en fin de celle-ci. La méthode de dosage de ces deux corps dans leurs mélanges décrite plus haut doit donc pouvoir être adaptée aux produits de l'hydrolyse sodique des protéines ; si les autres acides aminés présents n'en altèrent pas la précision. Une hydrolyse de 8 heures à 100° par la soude 5 N libérant la totalité de la tyrosine, on peut admettre qu'il en est de même du dérivé monoiodé et nous avons étudié dans quelle mesure les produits de destruction de la diiodotyrosine et de la thyroxine peuvent gêner le dosage de ce dernier. Les expériences que nous avons instituées dans ce but ont montré que la diiodotyrosine chauffée pendant 6 heures au bain d'huile à 115-120° dans la soude 5 N ne donne naissance qu'à des traces de monoiodotyrosine, correspondant à 2 p. 100 environ du dérivé diiodé (dosage de celui-ci par la réaction aux ions nitreux et dosage de la première par la réaction de MILLON). La dégradation de la thyroxine au cours d'essais identiques est importante ; elle peut atteindre 50 p. 100, mais ne libère qu'à de très faibles taux des corps donnant la réaction de MILLON. Environ 4 p. 100 de la thyroxine sont alors transformés en « extratyrosine ». Le tryptophane donnant une réaction colorée analogue à celle de MILLON, il y a lieu de l'éliminer, ce que la méthode de LUGG réalise en assurant la précipitation du dérivé mercurique de cet acide aminé dans des conditions où ceux de la tyrosine et de la monoiodotyrosine demeurent en solution. Enfin, nous sommes assurés que le dosage de la tyrosine en lumière filtrée par les écrans S_{53} et S_{47} du photomètre de PULFRICH donne les mêmes résultats en solution pure et dans un hydrolysât protéique, en sorte que la présence d'un certain excès d'acides aminés ne constitue pas

une cause d'erreur. Les résultats de ces essais justifient la méthode de dosage de la monoiodyrosine dans les protéines iodées que nous proposons.

Réactifs nécessaires :

Solution I : dissoudre dans 770 cm³ H₂O additionnés de 79 cm³ SO₄H₂ concentré 75 g SO₄Hg purifié, 55 g HgCl₂, 70 g SO₄Na₂ et compléter à 1000 cm³ avec H₂O.

Solution II : solution I diluée au demi par SO₄H₂N.

Solution III : solution à 6,9 p. 100 de nitrite de sodium fraîchement préparée.

SO₄H₂ 10 N ; SO₄H₂ 0,7 N ; NaOH 5 N.

Mode opératoire. — 100 à 500 Mg de protéine iodée sont additionnés de NaOH 5N (2 cm³ par 100 Mg) et chauffés pendant 8 heures au bain d'huile à 115-120° sous réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on transvase dans un ballon jaugé de 10-15 cm³ et l'on ajoute SO₄H₂ 10 N en quantité suffisante pour réaliser une acidité 0,7 N. On prélève une prise d'essai de 5 cm³ au maximum dans un tube à centrifuger (en complétant au besoin à 5 cm³ par SO₄H₂ 0,7 N) et l'on ajoute 5 cm³ de solution II. Après un séjour de 30 minutes à 60° et de 1 heure à 20°, on centrifuge le précipité renfermant le tryptophane. Le liquide surnageant est transvasé dans un ballon jaugé de 25 cm³ ; on réunit les eaux de lavage du précipité traité par 10 cm³ de solution II puis on complète à 25 cm³ par cette dernière. On ajoute ensuite 0,5 cm³ de solution III, ce qui provoque le développement de la réaction de MILLON. On agite, on centrifuge et l'on mesure au photomètre de PULFRICH sous 2 cm d'épaisseur l'intensité de la réaction dans les deux régions du spectre délimitées par les écrans S₅₃ et S₄₇, de cinq à quinze minutes après le mélange des réactifs. Les valeurs du coefficient d'absorption ainsi obtenues, M avec l'écran S₅₃ et m avec l'écran S₄₇, permettent de calculer les quantités x de monoiodyrosine et y de tyrosine présentes au moyen des formules :

$$x = \frac{2,10 M - 1,84 m}{0,97} \times 3,07 \text{ Mg de monoiodyrosine et}$$

$$y = \frac{1,25 m - 0,90 M}{0,97} \times 1,81 \text{ Mg de tyrosine}$$

Des exemples de données déterminées par cette méthode sur des iodocaséines préparés par la technique de REINEKE et TURNER (ioduration en milieu bicarbonaté) [169], et par celle de Von MUTZENBECHER (ioduration en milieu ammoniacal) [140] figurent dans le tableau XII.

TABLEAU XII.

Exemples de teneurs en monoiodotyrosine et en tyrosine d'iodocaséines de teneurs en iode diverses.

Caséine iodée selon le procédé de :	Iode total p. 100	Monoiodotyrosine p. 100	Tyrosine p. 100
REINEKE et TURNER	4,89	6,10	0,93
REINEKE et TURNER	6,76	3,60	0,20
LUDWIG et MUTZENBECHER....	4,67	7,00	0,85
LUDWIG et MUTZENBECHER....	7,85	6,25	0,07

Les conditions d'application du dosage de la monoiodotyrosine sont celles décrites à propos de son étude sur des mélanges de cet acide aminé et de tyrosine. Les quantités de ces corps qu'il convient de mettre en œuvre sont de 0,20 à 1,00 Mg du dérivé iodé et de 0,50 à 2,00 Mg de tyrosine dans la prise d'essai. Les remarques faites au sujet de la sensibilité maxima des lectures photométriques (p. 31) s'appliquent aussi bien au cas des acides aminés purs qu'à celui des hydrolysats protéiques et il est recommandé de faire un dosage en double sur deux échantillons d'une même iodoprotéine. L'erreur relative moyenne est alors de ± 7 p. 100 ; elle permet de définir avec sécurité et avec un degré d'approximation assez grand la teneur en monoiodotyrosine des protéines.

CONCLUSIONS.

Les méthodes colorimétriques (*) décrites dans ce travail méritent d'être brièvement discutées et comparées à celles actuellement en usage.

Le dosage de la thyroxine que nous proposons repose sur une réaction colorée de ce corps spécifique dans les conditions adoptées, alors que tel n'est pas le cas pour ceux qui sont basés sur le dosage de l'iode total d'une fraction des hydrolysats, elle constitue une technique moins fidèle que la nôtre dans les conditions où se sont placés ces différents auteurs. Quant à la méthode de BRAND et KASSEL [34], elle ne tient pas compte de la présence de monoiodotyrosine ; cette dernière, donnant

(*) Il va de soi que l'on peut substituer au photomètre de PULFRICH tout autre instrument de mesure colorimétrique, à condition de disposer des écrans sélectifs en présence desquels nous avons opéré. Dans les cas de la thyroxine et de la diiodotyrosine, la colorimétrie peut être réalisée sans écran, par comparaison de l'essai avec un témoin (solution titrée).

la réaction de MILLON moins intensément avant qu'après sa désioduration par les acides, fausse les dosages de tyrosine sur lesquels repose le calcul de la teneur en diiodotyrosine et en thyroxine. Aussi les résultats de nos recherches ont-ils permis de mettre au point une méthode plus satisfaisante que celles antérieurement décrites pour doser la thyroxine dans les protéines iodées.

Jusqu'ici la diiodotyrosine a été dosée dans les protéines thyroïdiennes par voie indirecte, à savoir : par différence entre l'iode total et l'iode thyroxinien (HARINGTON et RANDALL ; LELAND et FOSTER, BLAU) ou entre l'intensité de la réaction de MILLON avant et après désioduration (BRAND et KASSEL) ; elle ne l'a pas été dans les iodoprotéines artificielles. Or, le principe même des méthodes employées les expose à des erreurs par excès, en ce sens qu'elles rapportent à la diiodotyrosine l'halogène provenant de la décomposition de la thyroxine et celui de la monoiodotyrosine, très abondante dans certains produits. La méthode colorimétrique proposée est donc à la fois plus exacte et plus générale.

La monoiodotyrosine n'avait pas encore été dosée dans les protéines artificiellement iodées. L'application de notre méthode aux préparations thyroïdiennes permet d'affirmer que, comme l'avait prévu HARINGTON, celles-ci sont pratiquement dépourvues de cet acide aminé (*), alors que certaines iodoprotéines obtenues par voie chimique en renferment des taux importants, pouvant maintenant être précisées.

En dehors de leur intérêt analytique, les méthodes de dosage des trois acides aminés iodés à l'étude desquelles est consacré ce chapitre en présentent un autre. Leur application aux produits de l'ioduration chimique ou biologique des protéines permettra de suivre l'évolution de cette réaction dans des conditions diverses et, par là, d'étudier les modalités de la formation de la thyroxine.

(*) La monoiodotyrosine pure ajoutée aux hydrolysats protéiques est retrouvée quantitativement, que ces hydrolysats proviennent de thyroglobuline ou de toute autre protéine. La sensibilité de notre méthode atteignant 20 μg de cet acide aminé, il nous paraît certain que la thyroglobuline renferme moins de 0,1 p. 100 de ce corps ; toutefois, il n'est pas possible d'affirmer qu'elle en est rigoureusement dépourvue.

DEUXIÈME PARTIE.

Iodoprotéines artificielles.

Lorsque de l'iode est mis au contact de protéines en solution il se fixe sur certains acides aminés et en oxyde d'autres. L'étude chimique de ces réactions, en particulier de celles donnant naissance à la thyroxine a été féconde tant par ses applications biologiques que par son intérêt théorique. Nous exposerons dans cette partie les résultats d'ensemble obtenus dans ces deux domaines.

a. PRÉPARATION DES IODOPROTÉINES ET ACTION DE L'IODE SUR LES ACIDES AMINÉS.

Trois méthodes générales d'ioduration ont été mises en œuvre pour ioder les protéines : l'action de l'halogène en milieu acide, alcalin ou neutre.

Les résultats diffèrent suivant la température, l'agent d'ioduration et la concentration du milieu iodurant ; chacune d'elles comporte des avantages et des inconvénients particuliers [32]. HOFMEISTER [86] employant l'iode métalloïdique à température ordinaire en milieu acide a obtenu des produits de teneurs en iode définies à partir de diverses protéines. Cependant ces composés sont relativement pauvres en halogène, ce qui a fait considérer sa technique comme médiocre. Cet auteur a néanmoins signalé le premier que la tyrosine participait à la fixation de l'iode, car celle-ci va de pair avec la disparition de la réaction de MILLON. BLUM et VAUBEL [30, 31], ont proposé d'opérer en milieu bicarbonaté en substituant au métalloïde une solution iodo-iodurée ; l'acide iodhydrique provenant des réactions de substitution étant alors éliminé. Cette méthode a été adoptée par divers auteurs, notamment par OSWALD [145] opérant sur des protéines, des albuminoïdes, des peptones ; elle a été modifiée par KURAJFFF [100-101], lequel a proposé d'opérer en présence de carbonate de magnésium. Von Mu-

TZENBECHER [140] a adopté l'ioduration en milieu ammoniacal, par l'intermédiaire d'iodure d'azote, corps dont l'emploi direct a été préconisé par WORMALL [200]. En règle générale les iodoprotéines obtenues par le procédé de BLUM et VAUBEL sont plus riches en halogène que celles préparées en milieu acide et celles iodées en solution ammoniacale le sont plus encore, en sorte qu'il y avait lieu de se demander s'il existe des degrés définis d'ioduration.

Après élimination de l'halogène adsorbé souvent en abondance (LIEBEN et LASZLO [113]), les iodoprotéines lavées à l'alcool ou à l'acétone et longuement dialysées ne renferment d'iode que sous forme de combinaison organique. Dans ces conditions, l'hémoglobine de cheval, par exemple, fixe encore 6,0 p. 100 d'iode en milieu faiblement acide ou neutre, 7,8 p. 100 en solution bicarbonatée, 8,7 p. 100 en milieu ammoniacal et 9,6 p. 100 en présence de soude (BAUER et STRAUSS [13]). BLUM et STRAUSS [28-29], ont les premiers essayé de dissocier deux types de combinaisons halogénées dans les produits d'ioduration maxima. Partant des travaux consacrés par PAULY [154-155] et par PAULY et GÜNDERMANN [156], à l'halogénéation de l'imidazole et de ses dérivés, ils ont constaté que l'acide sulfureux élimine une partie de l'iode des protéines halogénées au maximum (iodoprotéines A) et les transforme en iodoprotéines B, de teneurs en iode plus faibles et constantes, par ailleurs mieux définies que celles des combinaisons A. Les produits d'halogénéation très rapide, en milieu bicarbonaté (iodoprotéines C), sont identiques aux dérivés B et les résultats obtenus par PAULY permettent de penser que les deux derniers renferment la totalité de leur halogène combiné à des radicaux carbonés de divers cycles ; tandis que, dans les premiers, une partie de celui-ci, plus labile et mobilisable par l'acide sulfureux, est fixé à l'azote de cycles ou de radicaux divers. De nombreux auteurs [103, 192, 74, 85, 12, 143, 33, 126, 112, 151] ont étendu la notion que le taux de l'iode des produits A et B est particulier à chaque protéine, ce qui permet d'envisager sa combinaison à divers acides aminés. Comme on pouvait le prévoir, il n'existe aucun rapport rigoureux entre les quantités d'iode fixées respectivement à l'azote et au carbone. Néanmoins, il demeure certain à la suite de ces premiers travaux que les protéines peuvent présenter deux types de combinaison avec l'iode et que les conditions dans lesquelles celui-ci est mis en œuvre lui permettent de s'unir à elles selon une seule de ces modalités ou selon les deux.

La complexité des réactions de l'iode avec des molécules de composition aussi hétérogène que les protéines est nécessairement très grande ; HOFMEISTER [86] remarquant que l'iode fait disparaître la réaction de MILLON des solutions de caséine, avait attribué ce fait à la destruction du groupement phénolique de la tyrosine, observation que BLUM et VAUBEL [30, 31] ont par la suite reliée à la formation de diiodotyrosine, dont l'isolement a été réalisé par OSWALD [145, 147, 150], et par WHEELER et JAMIESON [196]. BLUM et STRAUSS ont par ailleurs admis que la phénylalanine fixe l'halogène sur son cycle, ainsi que nous l'avons démontré beaucoup plus tard [132], mais cette réaction ne porte que sur une fraction assez faible de l'acide aminé. HOFMEISTER [86], puis OSWALD [48], BLUM et STRAUSS [28, 29], ont observé que non seulement les réactions de MILLON et de PAULY, mais aussi celles d'ADAMKIEWIEZ et de VOISENET [113], propres au tryptophane dans les protéines, deviennent négatives au cours de l'ioduration de celles-ci. Comme la formation du diiodotyrosine et de thyroxine aux dépens de la tyrosine explique alors la disparition d'un caractère particulier à cet acide aminé, on peut se demander dans quelle mesure une ioduration nucléaire du tryptophane n'explique pas les faits observés en ce qui concerne la réaction d'ADAMKIEWIEZ. Divers auteurs, entre autres, MUUS, COONS et SALTER [141], ABELIN [6], ont admis que cet acide aminé participe à l'ioduration des protéines. Par contre, PAULY [154], dont les conclusions ont été adoptées par REINEKE [164] n'a pas pu ioder le tryptophane libre lequel est pour lui, oxydé par l'halogène sans donner au préalable naissance à son dérivé de substitution.

L'ioduration du cycle imidazolique de l'histidine a été longuement discutée par BLUM et STRAUSS. En effet, PAULY et GUNDERMANN [156], PAULY [154] ont montré que les méthylimidazoles, la benzoylhistidine, l'anhydride d'histidine fixent facilement l'iode en donnant naissance à divers composés définis qu'ils ont réussi à isoler. Une première étape de la réaction aboutit à la formation de combinaisons dans lesquelles l'iode se fixe, par substitution, aux $-\text{CH}=-$ du cycle—(obtention de benzoyldiiodohistidine anhydride). Une seconde étape, plus difficile à réaliser conduit à la formation de dérivés, dans lesquels les atomes de carbone du cycle sont iodés au maximum et le groupement $-\text{NH}-$ de celui-ci transformé en $-\text{NI}-$. L'atome d'I ainsi fixé est mobilisé par SO_3H_2 en présence du-

quel les radicaux CI sont stables. La cinétique de la fixation de l'iode à l'histidine a été étudiée par LI [110-111]. Les monoiodo et 2.5 diiodohistidines ont été par la suite préparées par BRUNINGS [37]. Bien qu'elles n'aient pas été isolées des protéines iodées, il y a tout lieu de penser qu'elles en sont des constituants. Enfin, la disparition de la réaction du biuret des iodo-protéines A et sa réapparition après traitement de celles-ci par l'acide sulfureux indique probablement que l'hydrogène de radicaux —CONH— , de —NH_2 participe à des réactions de substitution.

En dehors de celles-ci, des processus d'oxydation modifient la composition et la structure des protéines. Elles sont incomplètement connues. La disparition de la réaction des groupements sulfurés par formation de sulfure de plomb en milieu alcalin et chaud traduit leur oxydation, et l'apparition d'iodure de méthyle, mise en évidence par BLUM et VAUBEL [30-31], la déméthylation de la méthionine. La rupture du cycle de divers acides aminés a été également envisagée, mais non démontrée. Pour PAULY [154], la disparition de la réaction d'ADAMKIEWICZ serait liée à la destruction du cycle indolique. Le noyau pyrrolique de la proline et de l'oxyproline serait de même ouvert par oxydation. Enfin l'apparition d'ammoniaque traduit probablement la désamination de certains acides aminés par l'hypoiodite (SCHMIDT) [190].

Ces hypothèses et ces faits ont inspiré des travaux dont les conclusions dépassent sensiblement les observations sur lesquelles elles ont été basées. BAUER et STRAUSS [13] [14] [15] se sont efforcés de montrer que l'ioduration d'une protéine comporte trois étapes successives en présence de quantités croissantes d'halogène. Dans le cas de la globine, protéine riche en histidine, la totalité de l'azote non mobilisable par SO_3H_2 correspondrait à la formation de diiodotyrosine et de diiodohistidine. Des données établies sur une globine et sur son dérivé nitré, dans lequel la tyrosine est transformée en 3-nitrotyrosine et ne peut plus de ce fait fixer qu'un atome d'iode en position 5, seraient favorables à cette manière de voir [15]. La tyrosine s'ioderait spécifiquement dans la globine jusqu'à ce que sa transformation en diiodotyrosine soit complète (fixation de 1. à 4.2. p. 100 I). Ceci fait, l'histidine se combinerait à l'halogène jusqu'à ce que la teneur en iode de la protéine atteigne 9.6 p. 100 ; enfin, un enrichissement plus grand en iode correspondrait à la combinaison de celle-ci à des radicaux

azotés. En fait, s'il est exact que la tyrosine présente des réactions de substitution nucléaires en position 3 et 5 plus facilement que les autres acides aminés, on sait aujourd'hui que celles-ci évoluent simultanément à d'autres. De plus, la dégradation d'une partie de la diiodotyrosine en présence d'un fort excès d'iode (REINEKE et TURNER) [173], permet de considérer le schéma de BAUER et STRAUSS, pourtant admis par de nombreux auteurs, comme ne donnant qu'une représentation incomplète et très grossière des faits et non comme l'expression de relations stoechiométriques précises. Une donnée quantitative exacte a été acquise par les recherches de NEUBERGER [143] sur les courbes de titration électrométrique de la zéine, protéine très pauvre en histidine et dépourvue de tryptophane et du produit de son ioduration complète. Il a été établi par COHN [43], par WIMIEK et SCHMIDT [199] que la transformation de la tyrosine en son dérivé diiodé va de pair avec d'importantes modifications de la dissociation de ses groupements phénol et amine ($pK\ NH_2 = 7,45$ au lieu de 9,21 et $pK\ OH = 6,45$ au lieu de 10,28). La zéine étant pratiquement dépourvue d'acides aminés halogénables dans leurs cycles autres que la tyrosine, on pouvait espérer suivre la fixation de l'iode sur elle avec assez de précision en se basant sur ce fait. La teneur en tyrosine de la zéine permettait de prévoir que l'ioduration de l'acide aminé serait complète pour une teneur en I de 7,45 p. 100 ; or la protéine fixe 7,65 p. 100 (non mobilisable par SO_3H_2). Sa capacité totale de fixation des acides et des bases n'est alors pratiquement pas modifiée, mais son pouvoir tampon diminue très fortement dans la zone de pH comprise entre 9 et 11 et augmente dans la même proportion entre 6 et 8. Il est donc légitime de conclure que la zéine fixe à peu près quantitativement l'iode sur la tyrosine ; probablement selon des modalités récemment étudiées par BERGER et SCHEFFER [18], par LI [111] sur des solutions de l'acide aminé pur. Le cas des autres protéines est nécessairement plus complexe en raison de la présence de divers acides aminés susceptibles de présenter des réactions nucléaires de substitution et sans doute aussi de différences de structure. C'est ainsi que, pour COHN, SALTER et FERRY [48], le groupement phénolique de la tyrosine est détruit en partie après ioduration de la globine, ce qui traduit alors la diminution de la capacité totale de combinaison de la protéine vis-à-vis des bases. Les récents travaux de LI [110], sur l'ioduration de la sérualbumine confirment cette

manière de voir. L'ioduration de l'insuline, protéine très riche en tyrosine 12 p. 100 peut être réalisée dans des conditions où elle porte uniquement sur celle-ci, malgré la présence d'histidine au taux de 4 p. 100 (HARINGTON et NEUBERGER) [74]. De même que celle de la pepsine, laquelle est très pauvre en second acide aminé (HERRIOTT) [84].

L'étude quantitative de l'ioduration de l'histidine dans les protéines n'a pas été envisagée jusqu'ici que par des moyens indirects (blocage des groupements hémaffines de la globine) (HAUROWITZ [79]).

Le problème le plus important de la biochimie des iodoprotéines à savoir, la formation de la thyroxine au sein de leur molécule, n'a été abordée que dans des recherches plus récentes.

b. FORMATION DE THYROXINE PAR IODURATION DES PROTÉINES.

Si la réaction de l'iode avec les protéines se bornait à la fixation de l'halogène à divers cycles, elle ne conduirait pas à des produits doués de l'activité biologique propre à la thyroglobuline et à ses dérivés. Avant même que la thyroxine n'ait été identifiée parmi les produits de l'hydrolyse alcaline des iodoprotéines, la présence dans celles-ci d'un principe actif sur les troubles caractéristiques du myxoedème avait été établie et leur usage thérapeutique envisagé.

ABELIN et ses collaborateurs [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9] ont longuement étudié l'action de ces produits sur le métabolisme de base et cherché à la rattacher à un constituant défini ; il est probable que la substance désignée par eux sous le nom d'homothyroxine est de la thyroxine impure ou un peptide riche en celle-ci. Toutefois, pour ABELIN l'activité des protéines iodées artificielles n'est pas rigoureusement identique à celle des préparations thyroïdiennes, elle se manifeste bien sur la métamorphose des amphibiens et le métabolisme de base, mais ferait défaut en ce qui concerne la glycogénolyse hépatique et l'accélération des rythmes respiratoire et cardiaque [130]. Les travaux de KAER [93] ont confirmé ceux d'ABELIN ainsi que ceux de LERMANN et SALTER [108] [51] [187] [36].

Il appartenait à LUDWIG et Von MUTZENBECHER [115] de montrer que la thyroxine est présente dans les protéines iodées, où elle est accompagnée de la 3.5 diiodotyrosine et de la 3.monoiodotyrosine comme l'ont confirmé LAUTENSCHLAGER

et BOCKMUHL [103]. L'isolement de cette dernière a été par la suite réalisée par HERRIOT [85] dans les produits de l'hydrolyse de pepsine iodée ; et la synthèse de la 3.iodo-L tyrosine a été récemment réalisée par HARINGTON et PITT RIVERS, le produit obtenu par les auteurs allemands (DL) étant racémisé et celui isolé par HERRIOT impur.

De la DL thyroxine a été isolée par LUDWIG et MUTZENBECHER dans les hydrolysats barytiques d'iodocaséines par une technique analogue à celle initialement proposée par KENDALL [97] et par HARINGTON [64] pour séparer cet acide aminé à partir des protéines thyroïdiennes. Le rendement des opérations est de 0,1 p. 100 en thyroxine dans des protéines renfermant de 7 à 9 p. 100 d'iode, comme l'ont rapidement contrôlé HARINGTON et PITT RIVERS [71]. Par la suite REINEKE et TURNER [168] ont réussi à obtenir 0,42 p. 100 du même corps à partir de produits préparés par une méthode différente, en quantité correspondant à 28 p. 100 de l'activité biologique de ceux-ci (échanges respiratoires) exprimée en thyroxine. Les produits isolés par ces divers auteurs sont à tous égards identiques à la thyroxine synthétisée par HARINGTON et BARGER [70] composition, spectre ultraviolet [128], comportement à l'analyse polarographique [191] et coefficient d'absorption spécifique [165], activité sur les échanges respiratoires. Etant donnée la configuration de la tyrosine dans la thyroglobuline d'une part et celle de la tyrosine dans les protéines soumises à l'ioduration, d'autre part, il était vraisemblable que l'hydrolyse alcaline à laquelle il est nécessaire de soumettre les iodoprotéines pour en libérer l'acide aminé provoque la racémisation de celui-ci, dont la forme originelle est le dérivé L. Celle-ci a été isolée par REINEKE et TURNER [169] des produits d'hydrolyse (13 heures au bain-marie bouillant) de l'iodocaséine par un mélange de 30 parties d'acide sulfurique et de 70 parties de n.butanol. L'addition d'eau à un tel mélange provoque la séparation du butanol renfermant en solution la L thyroxine et de nombreuses impuretés dont on la sépare ensuite. Le produit cristallisé obtenu contient 65,11 p. 100 I, $F = 236^{\circ}$ $[\alpha]_D = -4^{\circ}.2$ et présente une activité biologique deux fois plus grande que celle de la DL thyroxine sur les échanges respiratoires du cobaye et comme antagoniste du thiouracile [170]. Les iodoprotéines préparées selon le procédé des auteurs américains ne renfermerait que le dérivé L.

Ces importantes observations d'ordre qualificatif devaient

être logiquement suivies de recherches quantitatives sur la formation de thyroxine par ioduration des protéines. Celles-ci ont permis d'aborder divers problèmes dont l'étude est encore en évolution. C'est ainsi que REINEKE, TURNER et WILLIAMSON [173-174] ont fait principalement porter leur effort sur l'obtention de produits de teneur maxima en thyroxine et cherché à préciser les conditions d'ioduration les plus favorables. Le rendement en thyroxine de l'ioduration de diverses protéines (caséine, édestine, ovalbumine, sérumalbumines, sérumglobulines, thyroglobuline, protéines totales de l'arachide, du lait écrémé, du sérum, du soja) n'est pas identique. Il est apparu dès l'abord comme lié à la teneur initiale en tyrosine de celles-ci et à leur degré d'halogénéation, l'iode étant mis en œuvre dans des conditions constantes pour leur préparation. Néanmoins, la fibroïne de la soie de *Bombyx morii* bien que très riche en tyrosine (10,5 à 11,6 p. 100 selon l'origine) ne donne naissance qu'à des traces de thyroxine, qu'elle soit halogénée à l'état de suspension (LUDWIG et MUTZENBECHER) [115] ou dissoute sous forme de complexe de la cupriéthylènediamine (PITT RIVERS et MICHEL*) [137 bis] ; ce fait est sans doute lié à la structure particulière de cette protéine fibreuse. A cette exception près, les diverses protéines étudiées renferment, à partir d'un certain taux d'halogène et jusqu'à une valeur limite de celui-ci, de la thyroxine en quantité d'autant plus grande que leur teneur initiale en tyrosine est plus élevée. (LUDWIG et MUTZENBECHER, REINEKE, WILLIAMSON et TURNER, PITT RIVERS et RANDALL). MUUS, COONS, et SALTER [141] ont établi que l'ioduration de la sérumalbumine en milieu ammoniacal ne provoque l'apparition d'une activité sur les échanges respiratoires qu'à partir d'une teneur en iode de 6 p. 100, correspondant grossièrement à la fixation de deux atomes I par molécules de tyrosine. L'activité thyroïdienne augmente progressivement au fur et à mesure que la protéine s'enrichit en halogène et se maintient à un maximum à partir de 10 p. 100 I. Tout se passe donc comme si la formation de thyroxine n'avait lieu qu'après ioduration totale de la tyrosine et atteignait par la suite une limite supérieure. REINEKE, TURNER et WILLIAMSON ont poursuivi un important ensemble d'expériences sur le rendement en thyroxine, dosée par voies chimique, biologique (métamorphose des têtards, échange gazeux et perte de poids du cobaye), de l'ioduration des protéines par l'iode en poudre agissant en milieu très faiblement alcalin (bicarbonate de sodium). Dans ces

conditions, de la thyroxine se formerait en quantité assez grande même si l'on ne met en œuvre que deux atomes I par molécule de tyrosine et il existerait un optimum de rendement pour 5 à 6 atomes I environ. Par ailleurs, REINEKE, WILLIAMSON et TURNER [174] ont cherché à augmenter la production de thyroxine en faisant varier les modalités de l'ioduration. L'agitation du milieu à l'air et la prolongation du temps de chauffage après fixation de l'halogène sont considérées par eux comme très favorables. REINEKE et TURNER [171] ont constaté que l'addition au milieu de petites quantités de divers oxydes de manganèse, en particulier de l'oxyde salin Mn_3O_4 renforce la production de la thyroxine ; dans les cas les plus favorables, la teneur en celle-ci pourrait atteindre 4 p. 100 de l'iodocaséine, soit près de 40 p. 100 de la tyrosine initialement présente ; toutefois les réserves formulées précédemment au sujet de la méthode de dosage chimique employée par ces auteurs ne doivent pas être négligées pour interpréter ces résultats. Du point de vue pratique il semble qu'en l'état actuel de nos connaissances, la technique adoptée par les auteurs américains conduise aux produits biologiquement les plus actifs. Elle consiste à faire agir dans un premier temps de l'iode pulvérisé (6 atomes I par molécule de tyrosine) sur une solution à 2,5 p. 100 de protéine renfermant 0,7 p. 100 de bicarbonate de sodium, le réactif étant ajouté par petites portions dans le milieu porté à 37°C. soumis à agitation continue (agitateur de verre, 600 tours par minute) et additionné d'une petite quantité de Mn_3O_4 . L'absorption de l'iode étant complète à la fin de cette période, on chauffe à 70° pendant 18 à 20 heures dans les mêmes conditions. Un récent travail de PITT RIVERS [157] a mis en évidence la présence dans les protéines iodées en milieu bicarbonaté à chaud de 3.5 diiodo-4 hydroxybenzaldéhyde produit d'oxydation de la diiodotyrosine démontrant ainsi la complexité des réactions d'oxydation de cet acide aminé. L'existence de ce composé dans les hydrolysats conduit à une erreur par excès dans le dosage de la thyroxine selon REINEKE, TURNER et leurs Collaborateurs [172].

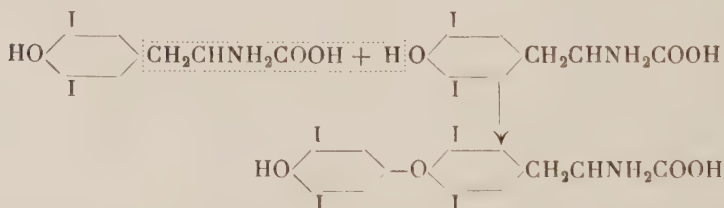
En résumé, les réactions d'oxydation évoluant simultanément à celles de substitution sont plus intenses lorsqu'on réalise l'halogénéation par la méthode de REINEKE et TURNER : certaines d'entre elles conduisent à une perte de thyroxine en présence d'un excès d'iode alors que, comme nous le verrons en discutant le mécanisme de la genèse de cet acide aminé, d'au-

tres favorisent sa formation. C'est dire combien l'action de l'iode sur les protéines ne saurait être ramenée à un processus chimique simple.

La multiplicité des réactions portant sur la tyrosine et ses dérivés n'est d'ailleurs pas le seul facteur de complexité. En effet, le rendement en thyroxine ne dépasse jamais un taux assez faible et celui en diiodotyrosine est toujours élevé dans les produits les plus riches en iode. Tel ne saurait être le cas si la totalité de la tyrosine présente était susceptible de participer à la formation de la thyroxine. L'observation de LI selon laquelle toutes les molécules de tyrosine de la sérumalbumine, de la pepsine ne s'iudent pas avec une vitesse identique illustre sans doute une différence de réactivité de divers restes de l'acide aminé en relation avec cet état de choses, lequel tient nécessairement à la constitution des protéines.

C. MÉCANISME CHIMIQUE DE FORMATION DE LA THYROXINE.

L'ioduration en 3 et en 5 de la tyrosine est une réaction au sujet de laquelle aucun problème particulier ne se pose. De ce fait la principale étape de la synthèse de la thyroxine à partir de la tyrosine peut être schématisée de la manière suivante (HARINGTON).



Ce mode de représentation de la genèse de la thyroxine à partir de la diiodotyrosine traduit le fait que la condensation de deux molécules de la seconde conduit à une molécule de la première avec perte d'une molécule d'alanine. Une première confirmation expérimentale de sa validité a été apportée par VON MUTZENBECHER [140]. L'incubation à 37° et en milieu faiblement alcalin de la diiodotyrosine conduit en deux semaines à la formation de thyroxine avec un rendement d'environ 0,1 p. 100. Cette importante observation a été confirmée par BLOCK [24], par JOHNSON et TEWKESBURY [90], par BARKDOLL et ROSS [11]. Comme l'ont fait remarquer HARINGTON et PITT RIVERS [73] l'intervention de processus d'oxydation ne doit pas néces-

sairement être envisagé pour expliquer le mécanisme de cette réaction. Néanmoins, il est très difficile de concevoir celui-ci comme une dissociation intermoléculaire et il est presque certain que sa première étape doit être un processus oxydant transformant la molécule de diiodotyrosine en un ou plusieurs produits moins stables et doués d'une plus grande réactivité. En effet, l'ioduration rapide des protéines à froid et en milieu ammoniacal conduirait presque exclusivement à la diiodotyrosine d'après NEUBERGER [143], HARINGTON et NEUBERGER [74] tandis que de la thyroxine se formerait à chaud et à $pH = 8.0$ en quantité d'autant plus grande que l'incubation des solutions en milieu aérobie est plus prolongée.

JOHNSON et TEWKESBURY [90], BARKDOLL et ROSS [11] ont apporté une première observation étayant cette hypothèse, en montrant que l'oxydation de la diiodotyrosine par l'eau oxygénée à 37° conduit à la formation de petites quantités de thyroxine. HARINGTON, PITT RIVERS [73] ont par la suite étudié ce phénomène et en ont précisé les modalités.

La réaction donnant naissance à la thyroxine par incubation de la diiodotyrosine pendant 14 jours à $38^{\circ} C.$ présente un optimum à $pH = 10.0$ auquel le rendement de la première est voisin de 3 p. 100, tandis qu'il est nul en milieu acide ou à très forte alcalinité. Le pH de la fonction phénol étant de 6.5 et des phénomènes accessoires que nous examinerons plus loin inhibant progressivement la réaction aux pH supérieurs à 10, il est probable que la diiodotyrosine doit nécessairement se trouver à l'état d'ion phénoxyde pour participer à celle-ci. La thyroxine ne se forme pas en l'absence d'oxygène et la présence d'eau oxygénée accélère sa vitesse, mais non son rendement au pH optimum. Si l'on opère dans des conditions où la thyroxine est extraite par le butanol au fur et à mesure de son apparition dans le milieu, il est possible d'en porter le rendement à 4 p. 100 en 15 heures à $100^{\circ}C.$ Pour HARINGTON et PITT RIVERS l'iode provenant de la décomposition de la diiodotyrosine serait l'oxydant efficace, tandis que JOHNSON et TEWKESBURY attribuent ce rôle à l'hypoiodite alcalin. La première hypothèse doit probablement seule être retenue. En effet, l'addition d'iode favorise la formation de thyroxine alors que tel n'est pas le cas de celle d'hypoiodites et que par ailleurs, les hyposulfites sont inhibiteurs ; enfin, la totalité de l'iode libéré en milieu fortement alcalin est transformée en hypoiodite et c'est l'absence d'iode libre à des pH supérieurs à 10 qui

paraît alors expliquer l'impossibilité d'obtenir de la thyroxine. Le caractère oxydant du processus est en outre illustré par l'isolement d'autres dérivés de la diiodotyrosine, récemment publiés par PITT RIVERS à savoir du triiodophénol et le 3.5 ; diiodo-4-hydroxybenzaldéhyde. Par ailleurs, REINEKE et TURNER ont montré que, divers facteurs d'oxydation favorisent la formation de la thyroxine à partir de la diiodotyrosine. Les rendements en la première seraient plus élevés en présence d'oxyde salin de manganèse lorsque le milieu est soumis à une violente agitation à l'air et il existerait un optimum thermique de la réaction à 60°C. Toutefois, la présence des produits d'oxydation de la diiodotyrosine est susceptible d'avoir faussé l'interprétation des résultats obtenus par les auteurs américains. Signalons enfin que le rendement en thyroxine peut être influencé par des facteurs d'une autre nature. En effet, PITT RIVERS [158] faisant incuber pendant 14 jours à 38° C un peptide de la N-acétyl-L-diiodotyrosine a recueilli de la thyroxine en quantité correspondant à 27 p. 100 du produit initial. Il est possible que le blocage du groupement aminé d'une part, et la présence d'un groupement électronégatif d'autre part aient favorisé la réaction de condensation.

Une représentation du mécanisme de la formation de la thyroxine à partir de la diiodotyrosine a été proposée par JOHNSON et TEWKESBURY [90] à partir des travaux poursuivis par PUMMERER [160, 161, 162] et ses collaborateurs sur l'oxydation des phénols, entre autres du p.crésol. Ces auteurs ont envisagé la condensation initiale de deux molécules de diiodotyrosine en un produit intermédiaire labile, dont la transformation en thyroxine libérerait une molécule de déhydroalanine ; cette dernière serait par la suite oxydée en acide pyruvique et ammoniac ou hydratée en sérine. Les deux premiers corps auraient été mis en évidence dans les produits de la réaction ; toutefois HARINGTON estime que la caractérisation de l'acide pyruvique réalisée par JOHNSON et TEWKESBURY n'emporte pas la conviction. La conception de ces auteurs paraît néanmoins devoir être conservée comme une féconde hypothèse de travail à la suite de la discussion faite par HARINGTON sur la résonnance de la structure normale des phénols en structures susceptibles de donner naissance aux ions phénoxydes.

L'étude chimique de la formation de la thyroxine conduit à deux conclusions principales. Elle montre que la diiodotyrosine est le précurseur du produit hormonal et elle illustre par

ailleurs le rôle des phénomènes d'oxydation dans le processus donnant naissance à celui-ci.

PRINCIPAUX PROBLÈMES POSÉS PAR L'IODURATION DES PROTÉINES ET OBJET DU TRAVAIL.

La nature des combinaisons formées dans les molécules protéiques lorsque celles-ci sont soumises à l'action de l'iode n'est actuellement connue qu'en ce qui concerne la monoiodotyrosine, la diiodotyrosine et la thyroxine. Il est peu probable que d'autres dérivés du même corps soient présents [50] [10] et l'hypothèse selon laquelle on y trouve de la thyronine ou des combinaisons du type 4-hydroxyphénylester de la thyronine doit être abandonnée.

Nous avons entrepris dans un premier chapitre l'étude quantitative de la formation de la monoiodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine lors de l'ioduration des protéines dans un milieu faiblement alcalinisé par le bicarbonate de sodium ou l'ammoniaque. Les méthodes de dosage de ces trois corps décrites plus haut permettent de suivre la transformation de la tyrosine en ses divers dérivés au cours de l'ioduration des protéines. Une telle étude est susceptible de donner des renseignements précis sur l'évolution des réactions que celle-ci comporte, laquelle n'a jusqu'ici fait l'objet d'aucun travail systématique.

Nous l'avons poursuivie sur deux protéines inégalement riches en tyrosine, à savoir la caséine et la thyroglobuline. Il était en effet, important de préciser dans quelle mesure la teneur en tyrosine déterminait à elle seule la valeur du rendement de la réaction en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine, ou si des facteurs structuraux propres à chaque protéine intervenaient par ailleurs. Dans ce domaine l'étude de la thyroglobuline offrait un intérêt particulier, en ce sens que, cette protéine étant physiologiquement la source de thyroxine, on pouvait se demander si certaines molécules de tyrosine occupant une position privilégiée, ne s'y transformaient pas en thyroxine, avec une facilité exceptionnelle, même par ioduration très rapide ou réalisée au moyen de teneur en halogène minime.

Par ailleurs, il y avait lieu de réaliser l'ioduration des pro-

téines dans diverses conditions, les unes pouvant favoriser les réactions de substitution, les autres celles de condensation des cycles, c'est pourquoi nous avons étudié simultanément l'halogénéation par l'iode en milieu bicarbonaté et celle par l'iodure d'azote en milieu ammoniacal.

Enfin s'il est très probable qu'au cours de l'ioduration des dérivés halogénés de l'histidine prennent naissance, la nature de l'action de l'iode sur le tryptophane tant dans les protéines qu'à l'état libre, n'a pas été établi. Nous exposerons dans un deuxième chapitre les résultats des recherches que nous avons entreprises à ce sujet.

RECHERCHES PERSONNELLES.

I^{er} CHAPITRE.

Sur la formation de la thyroxine et de ses précurseurs dans les iodoprotéines.

a. PLAN DES RECHERCHES, MATÉRIEL D'ÉTUDE ET TECHNIQUES.

Nous nous sommes proposés de préparer des iodoprotéines de teneur plus ou moins élevée en iode, afin d'y doser la tyrosine, la monoiodotyrosine, la diiodotyrosine et la thyroxine. Deux principaux facteurs paraissaient susceptibles de modifier l'évolution de la formation de ces dérivés. D'une part, la monoiodotyrosine, produit initial de l'halogénéation, doit donner naissance à la diiodotyrosine au fur et à mesure que les protéines s'enrichissent en iode. D'autre part, la synthèse de la thyroxine, réaction distincte de la précédente, doit être plus ou moins intense selon les conditions expérimentales adoptées. Les recherches de REINEKE TURNER sont à cet égard significatives ; elles ont en effet établi que la présence d'oxyde salin de manganèse, Mn_3O_4 augmente le rendement en thyroxine des opérations poursuivies en mettant en œuvre 6 atomes d'iode par molécule de tyrosine. Ceci étant, nous avons institué deux séries d'expériences où l'ioduration a été réalisée dans des mi-

lieux de potentiels oxydants divers, à savoir : par l'iode en poudre agissant à $pH = 7.8$ et en présence de bicarbonate de sodium et par des solutions iodo-iodurées ajoutées à des protéines dissoutes dans de l'ammoniaque à 5 p. 100.

Les protéines sur lesquelles ont porté nos recherches sont : la caséine de vache purifiée par dissolution en milieu ammoniacal et précipitation à $pH = 4.6$ et la thyroglobuline de porc, isolée par précipitation à $pH = 4.6$ d'extraits thyroïdiens préparés, par la technique de CAVETT, RICE et Mac CLENDON [40]. La première renfermait 15,6 p. 100 N et la seconde 15,9 p. 100 N.

Une première série d'iodoprotéines a été obtenue par la méthode de REINEKE, WILLIAMSON et TURNER [174] appliquée dans sa forme originale, à ceci près que le pH du milieu a été assez rigoureusement maintenu à $pH = 7,8$ par addition de bicarbonate de sodium au cours des opérations. L'ioduration a été réalisée en deux temps. Les solutions à 2,85 p. 100 de protéine renfermant 5 g CO_3NaH par 700 cm^3 , portées à 37° et soumises à une agitation mécanique continue (hélice de verre, 300 tours/minute), ont été additionnées d'iode en poudre. L'halogène a été ajouté par petites portions en quantités diverses, correspondant à des rapports précis entre le nombre de molécules-gramme de tyrosine présentes et celui d'atomes-gramme d'iode que l'on désirait mettre en œuvre. Après fixation de la totalité de l'iode sur la protéine, réalisée en 2 heures 30 minutes, la température a été portée à 70° et l'on a continué l'agitation et le chauffage pendant 20 heures, en vase clos. Après refroidissement à 15° , on a acidifié à $pH = 4,8$ par HCl 4N et centrifugé l'iodoprotéine précipitée. Celle-ci a été dissoute à $pH = 8,5$ par addition de soude et dialysée pendant 3 à 4 jours contre de l'eau distillée, jusqu'à disparition d'iode libre et d'ions I^- . Elle a été ensuite précipitée à $pH = 4,8$, lavée à l'eau acidulée par l'acide acétique et desséchée dans le vide sur anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant ; cette dernière opération exige plusieurs jours.

Une seconde série de produits a été préparée en faisant réagir à 0° les protéines en solution à 2 p. 100 dans l'ammoniaque diluée (5 p. 100) avec des solutions iodo-iodurées (3 g $I + 6$ g $IK + H_2O$ q.s.p. 50 cm^3), à la température de 0° (MUTZENBERGER) [140]. L'halogène, ajouté en quantité connue, est absorbé par la protéine en 10 à 30 minutes. Après séjour du milieu à 0° pendant 12 heures, l'iodoprotéine est séparée par préci-

pitiation isoclectrique à $pH = 4,5$ et traitée comme dans la première méthode de préparation. On remarquera que l'une et l'autre de celles-ci comportent un temps d'incubation plus ou moins long après fixation de l'halogène à la protéine ; ce mode opératoire est actuellement adopté par divers auteurs, considérant avec REINEKE et TURNER qu'il conduit à un rendement maximum en thyroxine.

L'ioduration des protéines étant un processus complexe, dans lequel évoluent de multiples réactions, on ne saurait plus admettre avec les anciens auteurs qu'elle conduit à des produits de composition rigoureusement constante, ses résultats sont reproductibles avec des écarts moyens de ± 5 p. 100 dans des conditions opératoires bien définies. Chacune des préparations obtenues a fait l'objet de dosages d'azote total (KJELDAHL) d'iode total (LEIPERT) [106], de tyrosine (LUGG) [119], de moniodotyrosine, de diiodotyrosine et de thyroxine par les techniques précédemment décrites. Les dosages ont été faits en double sur deux hydrolysats de chaque préparation, en sorte que les résultats doivent être considérés comme aussi satisfaisants que les méthodes employées permettent de l'espérer (erreur relative : 1 p. 100 pour N et I ; 4 p. 100 pour la diiodotyrosine et la thyroxine). En ce qui concerne la tyrosine et la moniodotyrosine, la précision des données obtenues est dans une certaine mesure fonction des taux respectifs de ces corps. Le dosage de la tyrosine est exact à 3 p. 100 près, tant que cet acide aminé n'est pas accompagné de plus de 75 p. 100 de son dérivé moniodé. De même, le dosage de ce dernier comporte une erreur ne dépassant pas 7 p. 100 dans les produits renfermant au moins 1 partie de moniodotyrosine pour 4 de tyrosine. La précision est environ moitié moindre dans les préparations très pauvres en l'un ou en l'autre des deux acides aminés.

b. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

TABLEAU XIII.

Teneurs en azote total, en iode total, en tyrosine, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine d'iodocaséines obtenues en présence de quantités diverses d'iode.

Atomes I mis en œuvre par mol. de tyrosine	N p. 100	I p. 100	Tyrosine p. 100	Monoiodo-tyrosine p. 100	Diiodo-tyrosine p. 100	Thyroxine p. 100
0 (témoin)	15,62	0	7,20	0	0	0
I. Action de l'iode en milieu bicarbonaté (pH = 7,8)						
0,95	13,20	1,95	4,53	2,22	1,04	0,22
2,83	12,40	5,12	1,10	6,00	2,97	0,47
4,50	12,60	6,76	0,20	3,63	4,23	1,45
6,90	12,00	8,08	0,10	1,66	6,52	1,66
10,00	11,92	9,20	traces	traces	5,30	0,85
17,00	10,10	7,93	néant	traces	5,49	0,82
II. Action de l'iode en milieu ammoniacal						
1,00	14,08	1,62	4,19	2,35	0,49	0,42
2,75	12,45	4,67	0,85	6,95	1,82	0,65
4,50	12,30	7,85	0,10	6,22	3,76	1,05
7,00	11,95	11,50	traces	0,80	9,30	1,65
10,00	11,92	11,10	0	0	9,60	1,85

c. EXAMEN CRITIQUE DES RÉSULTATS.

La discussion des données expérimentales obtenues ne saurait être utilement entreprise sans un examen critique de leur ensemble. A cet égard, certains résultats se dégagent des figures ou des calculs qu'il convient tout d'abord de présenter.

On trouvera dans les figures 5, 6 et 7, la représentation graphique des données rassemblées dans les Tableaux XIII et XIV. Ces figures illustrent la fixation de l'iode à la caséine et à la thyroglobuline, d'une part, la formation des dérivés iodés de la tyrosine en fonction de la quantité d'halogène réagissant avec ces protéines, d'autre part.

TABLEAU XIV.

Teneurs en azote total, en iode total, en tyrosine, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine d'iodothyroglobulines obtenues en présence de quantités diverses d'iode. Action de l'iode en milieu bicarbonaté, pH = 7,8 ().*

Atomes I mis en œuvre par mol de tyrosine	N p. 100	I p. 100	Tyrosine p. 100	Monoiodotyrosine p. 100	Diiodotyrosine p. 100	Thyroxine p. 100
0 (témoin)	15,92	0,27	3,30	0	0,22	0,102
1,00	14,28	0,50	2,70	0,47	0,36	0,118
2,00	14,10	1,41	2,30	0,54	0,75	0,228
2,75	13,33	1,23	1,99	0,65	0,77	0,163
4,50	13,17	2,06	1,70	0,92	1,50	0,200
6,00	13,65	3,52	1,00	0,65	2,55	0,686
7,00	12,68	3,65	1,10	0,52	2,31	0,603
10,00	12,83	5,17	0,44	0	3,08	0,501

(*) La thyroglobuline de porc utilisée pour ces recherches est pauvre en iode et de teneur en tyrosine normale, comme tel est en général le cas pour cette protéine au cours des mois d'hiver dans les élevages de la région marseillaise. Elle provenait de glandes fraîches, pesant en moyenne 12-14 grammes.

L'ioduration de la caséine s'opère progressivement jusqu'à une sorte de saturation, atteinte lorsque l'on met en œuvre 8 à 10 atomes d'iode par molécules de tyrosine. Ce phénomène

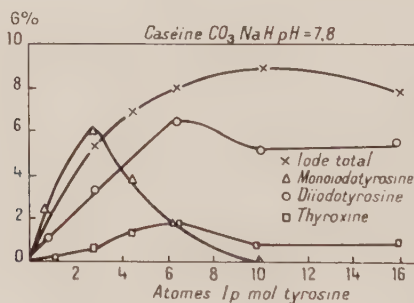


Fig. 5. — Teneurs en iode total, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine des iodocaséines en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en œuvre par molécule de tyrosine initialement présente. Halogénéation à pH = 7.8. Abscisses : atomes I par molécule de tyrosine. Ordonnées : p. 100 des constituants dosés.

a été signalé depuis longtemps par BLUM et STRAUSS [28, 29]. Il est plus net en milieu ammoniacal de faible potentiel oxydant qu'en milieu bicarbonaté (pH = 7,8), où un excès d'halogène conduit à une dégradation de la tyrosine entraînant

une perte en iode. La monoiodotyrosine prend naissance en abondance lorsque des quantités relativement faibles d'iode entrent en réaction et la diiodotyrosine se forme aux dépens

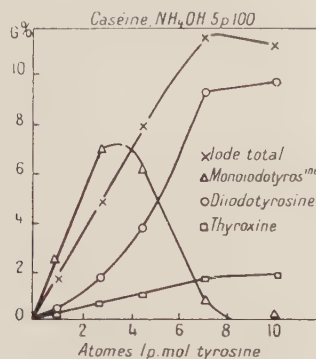


Fig. 6. — Teneurs en iode total, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine des iodocaséines en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en œuvre par molécule de tyrosine initialement présente. Halogénéation en milieu ammoniacal. Abscisses : atomes I par molécule de tyrosine. Ordonnées : p. 100 des divers constituants dosés.

de la première en présence d'un excès d'halogène. Le taux maximum en dérivé disubstitué a été atteint en milieu ammoniacal, où, contrairement à ce qui a lieu à $\text{pH} = 7,8$, l'action

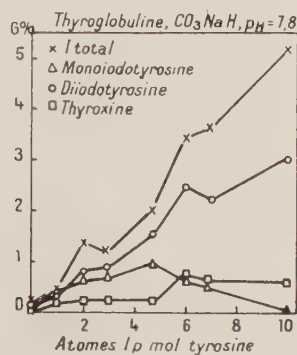


Fig. 7. — Teneurs en iode total, en monoiodotyrosine, en diiodotyrosine et en thyroxine des iodothyroglobulines en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en œuvre par molécule de tyrosine initialement présente. Halogénéation à $\text{pH} = 7,8$. Abscisses : atomes I par molécule de tyrosine. Ordonnées : p. 100 des divers constituants dosés.

de quantités massives d'iode ne l'abaisse pas. Il en est de même de la teneur en thyroxine des iodocaséines. Comme l'ont observé REINEKE et TURNER [171], le rendement en thyroxine

passer par un optimum lorsque l'on fait réagir 6 à 7 atomes d'iode par une molécule de tyrosine à $pH = 7,8$. Le même phénomène se manifeste dans le cas de la thyroglobuline et dans celui de la caséine. Par contre, il n'a pas lieu lorsque les protéines sont halogénées en solution ammoniacale. L'évolution de ces processus est très voisine dans les deux protides étudiés, à ceci près que la caséine, beaucoup plus riche en tyrosine, s'iode à un degré plus élevé que la thyroglobuline. Les différences observées dans le comportement de ces protéines traduisent à la fois l'inégalité du rendement de leur halogénéation en dérivés iodés et la plus grande réactivité d'une partie de la tyrosine dans la caséine. La signification de ces faits sera examinée plus loin.

Il a paru important de ne pas limiter cet examen d'ensemble à la formation des dérivés iodés de la tyrosine, mais de le faire porter en outre, d'une part, sur l'ioduration de la protéine en dehors de cet acide aminé et, d'autre part, sur la dégradation de la tyrosine par action de l'halogène sur les protéines. Nous nous sommes tout d'abord attachés à préciser dans quelle mesure la fixation de l'iode aux protéines s'opère sur le cycle benzénique de la tyrosine et porte sur d'autres acides aminés de la caséine et de la thyroglobuline, à divers degrés d'ioduration de celle-ci. Pour cela, nous avons calculé les taux d'iode de la monoiodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine de chaque échantillon, connaissant sa teneur en ces acides aminés et sachant que ceux-ci renferment respectivement 41,40 p. 100, 58,63 p. 100 et 65,35 p. 100 I. La somme des valeurs obtenues pour chacun de ces corps, soit $e = b + c + d$, correspond à la teneur de la protéine en iode fixé aux iodotyrosines et à la thyroxine. La différence entre la teneur en iode total a , et e indique la teneur de la protéine en iode combiné en dehors du cycle de la tyrosine (dérivé mono et diiodé et thyroxine). Les résultats de ces calculs ont été rassemblés dans le tableau XV.

L'examen de ce tableau fait ressortir sans ambiguïté que, dans tous les cas étudiés, de l'iode s'unit aux protéines en dehors de la tyrosine avant que le cycle de celle-ci n'ait fixé deux atomes d'halogène. Néanmoins, la formation des combinaisons étrangères à la tyrosine est notablement plus intense après blocage par l'iode des positions 3 et 5 du cycle de cette dernière. Elle est plus importante en milieu ammoniacal et, par ailleurs, la thyroglobuline et la caséine s'iodent inégale-

ment dans des conditions identiques, et cela en raison de leur diversité de composition et de structure.

Dans un autre domaine, nous avons cherché à mettre en évidence la dégradation éventuelle d'une partie de la tyrosine et de ses dérivés dans des réactions secondaires évoluant au cours de l'ioduration et auxquelles on peut attribuer la diminution du rendement en thyroxine en présence d'un fort excès d'halogène. Il convenait pour cela de calculer la teneur théorique en azote initialement apporté par la tyrosine dans chaque produit, d'une part, et celles en azote de la tyrosine, de la monoiodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine

TABLEAU XV.

Teneurs en iode total, en iode de la monoiodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine et en iode combiné en dehors de ces acides aminés, de caséines et de thyroglobulines à divers degrés d'halogénéation.

Atomes I mis en œuvre par mol de tyrosine	I p. 100 (a)	I de mono- iodotyro- sine p. 100 (b)	I de diodo- tyrosine p. 100 (c)	I de thyro- xine p. 100 (d)	Somme (b+c+d = e)	I non comb. à tyrosine (a-e)
A. — Iodocaséines obtenues en milieu bicarbonaté (pH = 7,8)						
0,95	1,95	0,92	0,61	0,14	1,67	+0,28
2,83	5,12	2,48	1,74	0,31	4,53	+0,59
4,50	6,76	1,51	2,49	0,95	4,95	+1,81
6,90	8,08	0,69	3,82	1,02	5,53	+2,75
10,00	9,20	0	3,12	0,56	3,68	+5,52
17,00	7,93	0	3,22	0,53	3,75	+4,18
B. — Iodocaséines obtenues en milieu ammoniacal						
1,00	1,62	0,97	0,40	0,27	1,64	-0,02
2,75	4,67	2,87	1,07	0,42	4,36	+0,31
4,50	7,85	2,57	2,21	0,69	5,47	+2,38
7,00	11,50	0,33	5,46	1,06	6,85	+4,85
10,00	11,10	0	5,63	1,18	6,81	+4,29
C. — Iodothyroglobulines obtenues en milieu bicarbonaté (ph = 7,8)						
1,00	0,50	0,19	0,21	0,08	0,48	+0,02
2,00	1,41	0,22	0,44	0,15	0,81	+0,60
2,75	1,23	0,27	0,45	0,11	0,83	+0,40
4,50	2,06	0,38	0,88	0,13	1,39	+0,67
6,00	3,52	0,27	1,50	0,45	2,22	+1,30
7,00	3,65	0,21	1,35	0,40	1,96	+1,69
10,00	5,17	0	1,81	0,33	2,14	+3,03

présentes dans les mêmes iodoprotéines, d'autre part. La première doit, en effet, être identique à la somme des secondes si la tyrosine et ses dérivés n'ont pas été altérés au cours de

la réaction. Dans le cas contraire, la différence entre ces deux données doit traduire l'existence et la grandeur de la perte en tyrosine initialement présente. La teneur en azote que cet acide aminé doit théoriquement apporter dans une iodoprotéine a été calculée par la formule :

$$\frac{\text{N p. 100 de l'iodoprotéine} \times \text{Tyrosine p. 100 de la protéine non iodée}}{\text{N p. 100 de la protéine non iodée} \times 100}$$

Soit f' la valeur obtenue. Soient respectivement a', b', c' et d' les teneurs en azote présent dans la tyrosine, la monoiodotyrosine, la diiodotyrosine et la thyroxine, calculées à partir du taux de ces acides aminés et sachant qu'ils renferment respectivement 7,74 p. 100, 4,56 p. 100, 3,23 p. 100 et 1,80 p. 100 N. La somme e' = a' + b' + c' + d', est égale à f' si

TABLEAU XVI.

Valeurs expérimentales des teneurs en azote de la tyrosine, de la monoiodotyrosine, de la diiodotyrosine et de la thyroxine d'iodocaséines et d'iodothyroglobulines à divers degrés d'ioduration et teneur théorique en azote apporté par la tyrosine initialement présente dans les mêmes produits.

Atomes I mis en œuvre par mol de tyrosine	N tyrosine p. 100 (a')	N monoiodotyrosine p. 100 (b')	N diiodotyrosine p. 100 (c')	N thyroxine p. 100 (d')	N de tyr. et dér. p. 100 (a'+b'+c'+d') = (e')	N théor. de tyrosine p. 100 (f')	Bilan (e' -- f')
A. — Iodocaséines obtenues en milieu bicarbonaté (pH = 7.8)							
0,95	0,351	0,101	0,034	0,0039	0,489	0,473	+0,016
2,83	0,085	0,274	0,096	0,0085	0,463	0,425	+0,038
4,50	0,016	0,166	0,137	0,0261	0,345	0,452	-0,117
6,90	0,008	0,076	0,211	0,0281	0,324	0,430	-0,106
10,00	0	0	0,171	0,0154	0,186	0,427	-0,241
17,00	0	0	0,177	0,0147	0,191	0,362	-0,171
B. — Iodocaséines obtenues en milieu ammoniacal							
1,00	0,324	0,107	0,022	0,0075	0,505	0,441	+0,064
2,75	0,066	0,317	0,059	0,0117	0,447	0,453	-0,006
4,50	0,008	0,284	0,122	0,0191	0,442	0,433	+0,009
7,00	0	0,036	0,300	0,0292	0,428	0,365	-0,063
10,00	0	0	0,310	0,0326	0,427	0,343	-0,084
C. — Iodothyroglobulines obtenues en milieu bicarbonaté (pH=7.8)							
1,00	0,209	0,024	0,0116	0,0021	0,244	0,228	+0,016
2,00	0,178	0,0246	0,0242	0,0041	0,224	0,224	0
2,75	0,154	0,0296	0,0249	0,0029	0,211	0,212	+0,001
4,50	0,131	0,0419	0,0485	0,0036	0,225	0,209	+0,015
6,00	0,077	0,0296	0,0824	0,0123	0,219	0,202	+0,017
7,00	0,085	0,0237	0,0746	0,0109	0,194	0,201	-0,007
10,00	0,033	0	0,0995	0,0090	0,141	0,204	-0,063

la tyrosine et ses dérivés n'ont pas été altérés au cours de l'ioduration. La différence : $e' - f'$ est alors nulle, alors que sa valeur négative objective l'existence de pertes lorsque f' est supérieur à e' . Ce calcul ne saurait être très rigoureux pour plusieurs raisons, entre autres la perte d'azote par désamination pouvant survenir au cours de l'halogénéation et l'imprécision du dosage de faibles taux d'acides aminés participant au bilan. Il permet néanmoins une approximation assez satisfaisante, comme il ressort de l'examen du tableau XVI.

Une fraction plus ou moins importante de la tyrosine est altérée dans tous les cas lorsque l'ioduration est réalisée en présence d'un assez grand excès d'halogène. Cette fraction est beaucoup plus faible dans les produits obtenus en milieu ammoniacal, l'iode d'azote étant dépourvu des propriétés oxydantes des hypoiodites. Par ailleurs, la destruction de la tyrosine est sensiblement moins intense dans la thyroglobuline que dans la caséine, toutes choses étant égales en ce qui concerne les conditions opératoires et les quantités d'iode réagissant avec une molécule de l'acide aminé (*).

C. DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Les données obtenues dans ce travail permettent de discuter brièvement divers problèmes dont les principaux sont : les modalités de la fixation de l'halogène aux protéines, l'évolution des réactions secondaires à l'ioduration proprement dite, en particulier la formation de thyroxine, et, enfin, le comportement de la caséine et de la thyroglobuline en présence d'iode.

1. *Sur la fixation de l'iode à la tyrosine dans les protéines.*

— Selon une conception développée par BAUER et STRAUSS [13, 14, 15], lorsqu'une protéine réagit avec des quantités croissantes d'iode, celui-ci se fixe d'abord à la tyrosine, puis au carbone du cycle d'autres acides aminés et, enfin, à l'azote nucléaire de ceux-ci. Cette hypothèse ne repose que sur des données à bien des égards incertaines et notre travail montre, d'une part, que la tyrosine ne fixe préférentiellement l'iode qu'à un très faible degré d'halogénéation et, d'autre part, que cette réaction comporte successivement la formation du dérivé monoiodé, puis celle du dérivé diiodé de l'acide aminé.

(*) Les valeurs positives de certains bilans n'ont aucune signification absolue ; elles correspondent à des bilans nuls et traduisent la marge d'erreur de l'ensemble des dosages.

Les teneurs en iode de la caséine et de la thyroglobuline dans lesquelles la totalité de la tyrosine serait présente à l'état de dérivé monoiodé sont, respectivement : 4,80 et 2,25 p. 100 I, celle des mêmes protéines où la tyrosine serait complètement diiodée : 9,16 et 4,41 p. 100 I. Or, la présence d'iode combiné en dehors de la tyrosine (Tableau XV, dernière colonne) est toujours très notable bien avant que de pareils taux d'halogène ne soient atteints, fait qui illustre la stérilité d'anciennes discussions tendant à établir une relation directe entre un certain degré de saturation en iode d'une protéine et sa teneur initiale en tyrosine. Les iodocaséines à taux d'iode inférieur à 5 p. 100 I et les iodothyroglobulines iodées à moins de 1,5 p. 100 I renferment de 80 à 90 p. 100 de l'halogène à l'état de monoiodotyrosine. La première étape de la réaction de substitution porte donc principalement sur la tyrosine, mais elle n'aboutit même pas à la saturation du cycle en iode sur la position 3 et n'affecte qu'une fraction assez faible de l'acide aminé. La transformation de la totalité de la tyrosine en dérivé monoiodé conduirait à un taux d'halogène de 4,80 p. 100 dans la caséine et de 2,25 p. 100 dans la thyroglobuline ; or les protéines de cette teneur en iode contiennent de la diiodotyrosine et d'autres dérivés iodés en quantité appréciable. Toutefois, la dihalogénéation de la tyrosine ne devient importante qu'à des taux d'iode assez élevés. C'est en effet à partir de la mise en œuvre de 6 atomes I par molécule de tyrosine que le taux du produit diiodé augmente très sensiblement, en même temps que les réactions de substitution sur d'autres cycles (histidine, phénylalanine) deviennent plus intenses, comme nous le discuterons par la suite. Dans ces conditions, la monoiodotyrosine se sature en iode et de la thyroxine se forme plus abondamment. Toutefois, les dérivés protéiques obtenus alors ne renferment jamais à l'état de diiodotyrosine et de thyroxine la totalité de la tyrosine initialement présente.

La représentation du processus d'halogénéation des protéines proposée par BAUER et STRAUSS [14, 15] comporte donc une part de vérité, en ce sens que la tyrosine est l'acide aminé qui fixe le plus facilement l'iode par une réaction de substitution ; mais elle ne saurait être retenue, car elle n'objective que très grossièrement et de manière trop absolue les étapes successives de ce processus, sans tenir compte, par ailleurs, des pertes en tyrosine. L'évolution de celle-ci mérite d'être discutée en même temps que celle de la production de thyroxine.

2. *Sur la formation de la thyroxine et sur la dégradation de la tyrosine et de ses dérivés au cours de l'ioduration des protéines.* — L'halogénéation de la tyrosine est une réaction de substitution distincte de la formation de la thyroxine, dont il convient d'examiner les modalités au cours de nos essais.

POUR REINEKE et TURNER [171], REINEKE, WILLIAMSON et TURNER [173, 174], il existe un rendement optimum en thyroxine lorsque la caséine, les protéines du lait total ou du soja, sont soumises à l'action de 4,5 atomes d'iode par molécule de tyrosine en l'absence de catalyseur d'oxydation, à celle de 6 atomes d'halogène par reste du même acide aminé lorsque le milieu renferme Mn_3O_4 . Nos résultats traduisent le même phénomène, à ceci près que la caséine et la thyroglobuline y donnent naissance aux quantités les plus grandes de thyroxine lors de la réaction de 6 atomes d'iode avec chaque molécule de tyrosine de la protéine, à $pH = 7,8$ en milieu bicarbonaté, sans adjonction d'aucun catalyseur. Par contre, il n'en est plus de même si la préparation de l'iodoprotéine est réalisée en solution ammoniacale : les produits les plus riches en iode ne sont pas plus pauvres en thyroxine que ceux obtenus en présence de 6 atomes d'halogène par molécule de tyrosine, mais ils sont plus riches en diiodotyrosine dans ces conditions.

Il est peu probable qu'il en soit ainsi parce que l'iode gêne alors la formation de la première et favorise celle de la seconde, puisque le rendement en ces deux dérivés passe par un maximum à un même degré d'halogénéation lorsque l'on réalise celle-ci en milieu bicarbonaté. On peut au contraire penser avec REINEKE et TURNER que, dans ce dernier cas, la thyroxine est oxydée par une réaction secondaire. Les données rassemblées dans le tableau XVI établissent que les autres dérivés de la tyrosine participent aussi à cette destruction. En effet, à partir d'un certain degré d'ioduration, la différence, N p. 100 de la tyrosine initialement mise en œuvre dans la protéine, N p. 100 de la tyrosine et de ses trois dérivés iodés dans l'iodoprotéine, traduit un déficit d'azote de plus en plus grand en fonction du degré d'ioduration des produits. Cette perte peut atteindre jusqu'à 55 p. 100 de l'azote de la tyrosine lorsque l'halogénéation a été opérée en milieu bicarbonaté à $pH = 7,8$; elle est très notablement moindre dans les produits obtenus en milieu ammoniacal. Elle ne correspond pas nécessairement à une destruction totale de l'acide aminé ou de ses dérivés ; elle peut aussi traduire la transformation de

ces corps en composés ne donnant plus les réactions caractéristiques sur lesquelles sont basées les dosages de la tyrosine et de ses produits d'ioduration. Pareil phénomène est peu important lorsque l'halogénéation est faible ; il le devient quand 6 à 7 atomes d'iode réagissent avec 1 molécule de tyrosine présente dans une protéine. Or, une forte augmentation du rendement en thyroxine se manifeste alors simultanément ; aussi est-il possible que des processus d'oxydation participent à la genèse de ce produit en même temps qu'ils altèrent une partie de la diiodotyrosine et de la thyroxine présentes. Un certain degré d'hydrolyse des protéines favorise peut-être les réactions secondaires à l'halogénéation.

Ces observations illustrent la complexité des conditions exerçant une influence sur la formation de la thyroxine. Le rendement final de ce corps est lié à de multiples facteurs, entre autres à sa destruction partielle et à celle de ses précurseurs en même temps qu'à sa production. Il en découle que la quantité de thyroxine apparaissant au cours de l'ioduration d'une protéine dépend des modalités de l'action des réactifs. La signification des données obtenues dans ce domaine n'est donc jamais absolue ; elle est fonction de la validité des comparaisons qu'il est permis de faire d'un essai à l'autre.

3. *Constitution des protéines et ioduration de la caséine et de la thyroglobuline.* — Il n'existe aucun parallélisme étroit entre teneurs d'une protéine en thyroxine et en ses précurseurs au cours de son halogénéation. Notre travail ne confirme pas sur ce point les données obtenues par RIVIÈRE, GAUTRON et THÈLY [175] au moyen des méthodes de dosage moins spécifiques que les nôtres. L'existence d'un pareil rapport impliquerait, d'une part, que la formation des iodotyrosines et celle de la thyroxine évoluent avec des intensités proportionnelles, et, d'autre part, que la totalité des premières est susceptible de donner naissance au produit hormonal. Or, l'expérience montre que les protéines s'enrichissent en diiodotyrosine et s'appauvrissent en thyroxine en présence d'un excès de réactif. En outre, à des taux d'halogènes relativement faibles, la plus grande partie de l'iode est présente dans de la monoiodotyrosine, laquelle n'est pas directement génératrice de thyroxine. Aussi, une constance du rapport : I thyroxinien / I diiodotyrosinien ou : I thyroxinien / I total, ne peut-elle être que fortuite.

L'absence d'une proportionnalité définie entre les teneurs en thyroxine et en iodotyrosines est manifeste dans nos essais.

Par ailleurs, un excès du dérivé diiodé apparaît à un degré d'halogénéation plus grand que celui où le rendement en thyroxine est maximum. Il en découle que toutes les molécules de tyrosine présentes dans la protéine ne réagissent pas identiquement avec l'iode. L'interprétation la plus simple de ces faits est que la position et l'état (mode de combinaison) des molécules de tyrosine dans les chaînes peptidiques déterminent leur aptitude à participer à la réaction génératrice de thyroxine. Celle-ci n'est sans doute possible qu'entre deux restes de tyrosine voisins. Lorsque leur éloignement ou leur orientation empêche ceux-ci de réagir, l'acide aminé demeure à l'état de diiodotyrosine ou est détruit par des processus secondaires d'oxydation. Dès lors, la notion d'un rapport entre la teneur en tyrosine d'une protéine et son aptitude à donner naissance à de la thyroxine apparaît comme trop sommaire. Elle doit être complétée par celle de la présence de certaines molécules de tyrosine dans une position privilégiée favorable à leur condensation après ioduration. Il est possible que la réactivité de ces molécules soit aussi liée au blocage du groupement aminé ou carboxylique du reste d'alanine fixé au cycle benzénique ; des essais poursuivis sur des peptides de la tyrosine de constitution convenablement choisis permettront sans doute d'établir à cet égard des données significatives.

La teneur en tyrosine et la structure d'une protéine déterminant son comportement en tant que corps générateur de thyroxine et de ses précurseurs, il n'est pas surprenant que l'ioduration de la caséine et celle de la thyroglobuline n'évoluent pas de manière rigoureusement identique. Toutes choses étant égales en ce qui concerne les modalités de l'ioduration, le rendement de la caséine en thyroxine est nettement supérieur à celui de la protéine thyroïdienne. Cependant, la teneur en azote thyroxinien de l'iodoprotéine, exprimée en p. 100 de celui initialement apporté par la tyrosine, est très voisine dans les deux produits obtenus en milieu bicarbonaté avec un rendement optimum en thyroxine. En effet, l'azote thyroxinien représente alors 6,51 p. 100 de N de la tyrosine totale théoriquement présente dans l'iodocaséine (6,9 atomes I par molécule de tyrosine) et 6,80 p. 100 dans la thyroglobuline iodée (6 atomes I par molécule du même acide aminé). Il en découle que, dans un cas comme dans l'autre, une fraction très peu différente de la tyrosine totale est génératrice de thyroxine dans des conditions identiques. Par contre, la teneur en azote

de la diiodotyrosine (p. 100 de N de tyrosine initialement présente) est égale à 49,7 p. 100 dans la même iodocaséine et à 37,6 p. 100 dans la même iodothyroglobuline. Enfin, la teneur en azote de la monoiiodotyrosine (p. 100 de N de la tyrosine initialement présente) est de 17,6 p. 100 dans la première et de 13,6 p. 100 dans la seconde. Tout se passe donc comme si la fraction génératrice de thyroxine réagissait identiquement dans les deux protéines et si l'autre fraction de la tyrosine présentait un comportement particulier dans la caséine et dans la thyroglobuline. Le fait que la formation de diiodotyrosine en abondance exige des quantités d'iode plus importantes dans la thyroglobuline que dans la caséine est favorable à cette hypothèse. De même, la réactivité de l'histidine vis-à-vis de l'iode ne paraît pas être identique dans ces deux corps.

De toute manière, la structure de la protéine intervient directement dans l'aptitude de la tyrosine qu'elle renferme à donner naissance à de la thyroxine sous l'action de l'iode. A cet égard, la thyroglobuline ne présente aucun caractère particulier, mais il n'est pas certain que son ioduration physiologique procède par le même mécanisme que son halogénéation par voie chimique. Néanmoins, on peut se demander dans quelle mesure la spécificité du corps thyroïde en tant que lieu de formation de la thyroxine tient à la présence d'un système enzymatique d'ioduration efficace plutôt qu'à la nature de la protéine servant de substrat à ce dernier.

2^e CHAPITRE.

Action de l'iode sur le tryptophane dans les protéines et à l'état libre.

Nous nous sommes proposés de doser le tryptophane dans les protéines iodées afin d'étudier sa disparition dans celles-ci en fonction de leur degré d'halogénéation. Par la suite, nous avons cherché à établir le mécanisme de l'action de l'iode sur cet acide aminé, tant dans les protéines qu'en solution pure.

A. — ACTION DE L'IODE SUR LE TRYPTOPHANE DANS LES PROTÉINES.

L'étude que nous nous proposons de faire a tout d'abord exigé des essais sur le dosage du tryptophane dans les iodo-protéines. Celui-ci s'est en effet révélé impossible par les méthodes usuelles basées sur les réactions aldéhydiques de l'indylalanine, en raison de l'oxydation du formol, ou des autres aldéhydes qu'elles mettent en œuvre, par l'iode libéré au cours des opérations. Par contre, l'application de la méthode de LUGG [118], reposant sur la colorimétrie de la réaction brun-rouge se développant dans les mêmes conditions que celle de MILLON après séparation du tryptophane à l'état de combinaison mercurique, s'est montrée satisfaisante. Nous l'avons utilisée en substituant aux mesures colorimétriques des dosages au photomètre de PULFRICH (filtre S_{47}), en nous référant à une courbe d'étalonnage ; cette dernière est une droite pour des quantités de tryptophane comprises entre 0,125 et 0,750 Mg. Ni la thyroxine, ni la diiodotyrosine et la monoiodotyrosine, ni les iodures n'en altèrent la précision et la fidélité ; il en est de même de l'ensemble des acides aminés halogénés de l'iodozéine, protéine ne renfermant pas de tryptophane. La méthode est exacte à 5 p. 100 près pour des teneurs en tryptophane de 0,5 p. 100 et au-dessus ; elle est sensiblement moins pour des produits plus pauvres en indylalanine.

Nous avons pris comme matériel d'étude des caséines et des thyroglobulines iodées dont la préparation a été décrite dans le chapitre précédent. Une série d'entre elles a été halogénée

à $pH = 7.8$ par l'iode en poudre ajouté à une solution de protéine additionnée de bicarbonate de sodium (REINEKE et TURNER [173]) ; une autre l'a été en milieu ammoniacal (5 p. 100) par un procédé très voisin de celui décrit par Von MUTZENBECHER [140]. L'ioduration en présence de quantités diverses d'halogène nous a permis de disposer de produits dont les teneurs en iode, déterminées par la méthode de LEIPERT [106], s'échelonnent dans des limites très larges. 200 Mg de chacun ont été hydrolysés par 5 cm³ NaOH 5 N à 100° en tube scellé pendant 20 heures et traités en vue du dosage du tryptophane selon LUGG. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau XVII.

TABLEAU XVII.

Teneurs en tryptophane d'iodocaséines et d'iodothyroglobulines préparées dans des conditions diverses.

Nombre d'atomes I mis en œuvre par mol. de tyrosine pour halogéner la protéine	Caséine iodée				Thyroglobuline iodée	
	sol. CO ₃ NaH pH = 7,4		sol. NH ₄ OH p. 100		CO ₃ NaH, pH = 7,4	
	I p. 100	Tryptophane p. 100	I p. 100	Tryptophane p. 100	I p. 100	Tryptophane p. 100
0	0	1,50	0	1,50	0,27	2,50
0,95	1,95	1,47	—	—	—	—
1,00	—	—	1,62	1,07	0,50	1,80
2,00	—	—	—	—	1,41	1,94
2,75	—	—	4,67	0,60	1,23	1,52
2,83	5,12	1,31	—	—	—	—
4,50	6,76	1,09	7,85	0,44	2,06	1,62
6,00	—	—	—	—	3,52	1,49
6,90	8,08	0,82	—	—	—	—
7,00	—	—	11,50	0,33	3,65	1,40
10,00	9,20	0,33	10,10	0,10	5,17	1,07

La teneur en tryptophane diminue donc progressivement en fonction du degré d'ioduration de la protéine dans chacune des trois séries de préparations. Néanmoins des différences se manifestent à cet égard, d'une part, entre la caséine et la thyroglobuline et, d'autre part, selon les modalités de l'ioduration d'une même protéine. La caséine, plus riche en tyrosine que la thyroglobuline, fixe relativement plus d'iode, surtout en milieu ammoniacal (iodure d'azote). La diminution du taux du tryptophane dans ce dernier cas est très importante elle

répond alors à des conditions particulièrement favorables soit à une réaction de substitution, soit à la dégradation de l'acide aminé. Par ailleurs, une partie de l'acide aminé présente dans la thyroglobuline une labilité plus grande que dans la caséine, puisque son taux est réduit d'environ 25 p. 100 dans la première après action d'un atome d'iode par molécule de tyrosine à $pH = 7.8$, alors que tel n'est pas le cas dans la seconde. Ce fait doit être relié à la diversité de structure des deux protéines. De toute manière, une disparition très importante de l'indylalanine ne se manifeste dans tous les cas qu'à un degré d'halogénéation élevé, lorsque l'ioduration de la tyrosine est complète (*).

La diminution d'intensité de la réaction colorée sur laquelle repose la méthode de LUGG ne peut être interprétée simplement. Selon cet auteur, l'indol et ses dérivés dans lesquels l'atome d'hydrogène α du cycle pyrrolique n'est pas substitué présentent la propriété de se colorer en brun-rouge dans les conditions choisies. Dès lors, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer les faits observés. Ceux-ci peuvent traduire soit une ioduration progressive du tryptophane avec formation d'un dérivé de substitution nucléaire ne donnant pas la réaction colorée, soit une oxydation détruisant le cycle pyrrolique. La première éventualité apparaît comme peu probable à la suite de l'expérience suivante, au cours de laquelle nous avons cherché à décomposer des combinaisons iodées du tryptophane éventuellement présentes.

Lorsque la diiodotyrosine est traitée à 100° par le stannite de sodium, elle perd progressivement son iode en régénérant de la monoiodotyrosine, puis de la tyrosine, phénomène sur lequel BRAND et KASSEL [34] ont basé une méthode de dosage dont nous avons précédemment fait la critique. Nous avons recherché si pareil traitement faisait réapparaître du tryptophane lorsqu'il est appliqué aux iodoprotéines dans lesquelles une partie de cet acide aminé est soit « dissimulé » en raison de son halogénéation, soit détruit.

100 Mg de diverses iodoprotéines ont été additionnés de 2 cm^3 d'une solution aqueuse renfermant 5 g de chlorure stanneux et 22 g de soude par 100 cm^3 dans un tube à essai que l'on a scellé sous vide. Après séjour de 20 heures à 100° , le

(*) La disparition totale de la réaction d'ADAMKIEWICZ dans les protéines iodées au maximum, par les auteurs dont les travaux ont été cités plus haut est due au manque de fidélité des réactions aldéhydes du tryptophane en présence de traces d'iode.

tryptophane a été dosé par la méthode de LUGG et des dosages de tyrosine et de monoiodotyrosine ont été faits par ailleurs pour contrôler l'efficacité de l'action du stannite de sodium. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII.

Désioduration d'iodocaséines par action du stannite de sodium à 100°.

Condition d'étude de la protéine	Tryptophane p. 100	Tyrosine p. 100	Monoiodotyrosine p. 100
Caséine iodée à pH = 7,4 (CO ₂ NaH) I p. 100 = 8,80 ; diiodotyrosine p. 100 = 6,52			
Avant désioduration..	0,82	0,10	1,66
Après désioduration..	0,71	0,80	3,60
Caséine iodée à pH = 7,4 (CO ₃ NaH) I p. 100 = 9,20 ; diiodotyrosine p. 100 = 3,76			
Avant désioduration..	0,30	0	0
Après désioduration..	0,20	2,47	4,72
Caséine iodée sol. NH ₄ OH, ; I p. 100 = 7,85 diiodotyrosine p. 100 = 3,76			
Avant désioduration..	0,40	0,10	6,22
Après désioduration..	0,30	2,70	5,10
Caséine iodée sol. NH ₄ OH ; I p. 100 = 11,50 diiodotyrosine p. 100 = 9,30			
Avant désioduration..	0,30	0	0,80
Après désioduration..	0,26	2,20	2,50

La constance, aux erreurs d'expérience près, de la teneur en tryptophane des caséines avant et après désioduration par la stannite de sodium contraste avec la régénération de la tyrosine et de la monoiodotyrosine due à cette dernière. Dès lors, il est peu probable que les iodoprotéines renferment un dérivé halogéné du tryptophane ; cet acide aminé doit plutôt être oxydé au cours de la préparation des iodocaséines.

B. — ACTION DE L'IODE SUR LE TRYPTOPHANE EN SOLUTION PURE.

La fixation de l'iode au cycle indolique du tryptophane envisagée par NEUBERG [142] n'a pu être démontrée expérimentalement et, pour PAULY [154], l'acide aminé soumis à l'action de l'iode serait oxydé sans présenter au préalable de substitution nucléaire. Il se comporterait à cet égard d'une toute autre manière que la tyrosine et que l'histidine, dont des dérivés diiodés stables prennent alors naissance (OSWALD [145], WHEELER et JAMIESON [196], LI [110] [111].) Des essais

préliminaires nous ont montré [132] que le tryptophane en solution ammoniacale réagit avec l'iode, sans que la nature de ce processus ait été précisée. Nous avons cherché à la définir en dosant l'iode libre, les iodures et le tryptophane dans des solutions de celui-ci additionnées de quantités croissantes d'halogène. En effet, les réactions de substitution donnant naissance à de l'acide iodhydrique selon l'équation : $\text{RH} + \text{I}_2 = \text{RI} + \text{HI}$, on pouvait espérer suivre leur évolution par l'établissement de bilans des corps y participant. Nous avons poursuivi à ce sujet les expériences suivantes :

1°. — Action de l'iode en milieu boraté. 5 cm³ de solution à 1,05 p. 100 de tryptophane ($\text{pH}=8,4$) sont additionnés de 20 cm³ d'une solution tampon borato-borâtée (SÖRENSEN) de $\text{pH} = 8,5$ et d'iode en poudre, mis en œuvre en quantités croissantes. Après séjour de 22 heures à 37° en flacon émeri au cours duquel on agite fréquemment, on refroidit à 0° et l'on extrait l'iode par le sulfure de carbone après acidification. L'halogène libre ainsi séparé est dosé colorimétriquement au photomètre de PULFRICH (filtre S_{50}) en se reportant à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions sur des solutions titrées. L'iode des iodures est dosé par la même technique après élimination de l'halogène libre et action du nitrite de sodium en milieu acide, le tryptophane par la méthode de LUGG sur une prise d'essai extraite au sulfure de carbone.

TABLEAU XIX.

Action de l'iode sur le tryptophane à l'état libre.

Iode mis en œuvre		Mg retrouvés en fin d'expérience			Bilan I (Mg) (b + c) — a
Mg dans l'essai (a)	Atome I par molécule de tyrosine	Trypto- phane	Iode libre (b)	Iode des iodures (c)	
A. — Essais en milieu boraté					
0	0	51	0	0	0
63,5	2	32,5	0	59,5	—4
127,0	4	14,7	0	124	—3
190,5	6	3,5	0	190	—0,5
254,0	8	1,9	13	238	—3
B. — Essais en milieu bicarbonaté					
0	0	51	0	0	0
63,5	2	27,8	0	60	—3,5
127,0	4	10,4	0	125	—2
190,5	6	4,5	0	195	+4,5
254,0	8	1,8	27	219	—8

2°. — Action de l'iode en milieu bicarbonaté : 5 cm³ de solution à 1,5 p. 100 de tryptophane ($pH = 8,4$) sont placés dans un tube à essai de 40 cm³ avec 15 cm³ d'eau, 5 cm³ d'une solution de bicarbonate de sodium à 3,5 p. 100 et de l'iode pulvérisé en quantités croissantes. On scelle sous vide les récipients, que l'on place 22 heures à 37° en les agitant de temps en temps. L'iode libre, celui présent dans les iodures et le tryptophane sont dosés en fin d'expériences par les techniques indiquées plus haut. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XIX.

On n'observe donc aucune fixation appréciable d'iode au tryptophane dans les conditions de nos expériences. L'acide aminé disparaît du milieu en même temps que l'halogène, lequel est quantitativement réduit en hydracide. Un très léger excès d'iode (5 à 10 p. 100) demeure présent lorsque 8 atomes Iode réagissent avec une molécule de l'acide aminé ; mais on ne saurait donner une représentation simple de la réaction d'oxydation, car le rapport du nombre de molécules de tryptophane dégradées au nombre d'atomes d'iode réduits diminue en fonction de la quantité d'halogène mise en œuvre. De toute manière, comme la réaction colorée propre aux dérivés indoliques à noyau pyrrolique intact et non substitué en α disparaît en même temps que l'iode est réduit, il y a lieu d'admettre que l'oxydation du tryptophane comporte alors la rupture du cycle pyrrolique.

C. — DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

L'iode participe à des réactions nucléaires de substitution avec la tyrosine et l'histidine lorsqu'il se combine aux protéines. L'ensemble de nos résultats montre que le tryptophane ne se comporte pas à cet égard comme ces acides aminés, même en présence d'un fort excès d'halogène. En effet, on observe bien alors une diminution progressive de l'intensité des réactions colorées qui caractérisent l'indylalanine, mais celle-ci n'est pas régénérée dans les conditions où la diiodotyrosine est désiodée par action du stannite de sodium. Ce fait implique soit l'absence d'iodotryptophane dans les protéines halogénées, soit la dégradation par l'iode du cycle pyrrolique de l'indylalanine.

La seconde hypothèse doit être adoptée. En effet, la totalité de l'iode réagissant avec le tryptophane en solution pure don-

ne naissance à de l'acide iodhydrique, ce qui exclut la formation d'un dérivé halogéné. Comme la réaction colorée permettant de doser le tryptophane devient alors de plus en plus faible, il en découle que l'action oxydante de l'iode conduit à la destruction du cycle indolique, probablement par ouverture du noyau pyrrol. Au demeurant, si l'on calcule la teneur en iode théorique des protéines saturées d'halogène en admettant que la totalité de la tyrosine et de l'histidine y existent à l'état de dérivés diiodés, les valeurs obtenues sont peu éloignées de celles déterminées par dosage. Toutefois, comme une partie des acides aminés est alors oxydée par l'iode, il n'était pas possible d'exclure sans preuves la formation de dérivés iodés du tryptophane par action de l'halogène sur les protéines.

TROISIÈME PARTIE.

Protéines thyroïdiennes

L'étude des protéines thyroïdiennes présente des intérêts multiples. En effet, la formation biologique de la thyroxine s'opère dans une molécule protéique en quelque sorte spécialisée, présente dans les vésicules colloïdes de l'organe : la thyroglobuline. Il est, de ce fait, important de définir cette protéine dans la mesure du possible et d'étudier sa composition et ses propriétés. Par ailleurs, on sait depuis longtemps que le corps thyroïde est susceptible de présenter des variations importantes dans sa teneur en iode, et il y a lieu de préciser si celle-ci relève d'un défaut de sécrétion d'une thyroglobuline iodée en proportions invariables ou si le degré d'halogénéation de cette protéine est susceptible de se modifier sous diverses influences.

Ceci étant, nous nous sommes proposés d'étudier dans un premier temps la préparation de la thyroglobuline pure et non dénaturée, les méthodes décrites jusqu'ici ne paraissant pas satisfaisantes à cet égard. Ayant obtenu des produits pouvant être considérés comme purs, nous avons, dans un second temps, étudié leur composition en acides aminés et leurs caractères physicochimiques, ce qui nous a permis de proposer une définition de la thyroglobuline reposant sur des critères de pureté aussi bien définis qu'il soit possible d'en disposer actuellement en biochimie des protéines.

1^{er} CHAPITRE.

Etude de la préparation de la thyroglobuline.

I. — L'isolement d'iodoprotéines thyroïdiennes a été opéré par diverses techniques dont les modalités reflètent deux préoccupations dominantes : d'une part obtenir des produits homogènes pouvant être considérés comme des corps purs ; d'autre part rechercher si la glande renferme ou non un mélange d'iodoprotéines correspondant à divers degrés d'halogénéation et, le cas échéant, les séparer. La solution de l'un et l'autre problèmes est nécessairement liée à l'obtention de protéines pures.

Après les travaux préliminaires de BAUMANN et ROOS [17], de BUBNOW [38], de GOURLAY [60], d'HUTCHISON [87-88], montrant le caractère globulinique des fractions iodées de l'extrait thyroïdien, OSWALD [145] entreprit l'étude de la thyroglobuline, qu'il proposa de séparer par précipitation acétique après fractionnement au sulfate d'ammonium à demi-saturation. Le mode opératoire d'OSWALD conduisant, selon HEIDELBERGER et PALMER [80] à un produit dénaturé, ces auteurs lui ont substitué la précipitation de la thyroglobuline au sulfate de sodium à 21 g pour 100 cm³ après délipidation au toluène et séparation d'un nucléo-protéide insoluble à pH = 4,8-5,0. Pour CAVETT et SELJESKOG [41] les préparations ainsi obtenues sont en partie dénaturées et renferment des lipides en quantité appréciable. Il n'en serait plus ainsi lorsque la protéine est préparée par extraction à 0° au moyen d'une solution isotonique de chlorure de sodium, de coupes minces de l'organe congelé, et précipitation de la thyroglobuline entre 35 et 45 p. 100 de la saturation des solutions en sulfate d'ammonium.

Bien que cette protéine (HEIDELBERGER et PALMER) soit homogène au regard de l'ultracentrifugation et de l'électrophorèse (HEIDELBERGER et SVEDBERG [82], HEIDELBERGER et PEDERSEN [81], LUNDGREN [120]), la question de la présence de plusieurs thyroglobulines dans le corps thyroïde demeure ouverte. ABELIN et KELLER [8], BLUM, LEHMANN et LEISTNER [27] et, plus

récemment, RIVIÈRE, GAUTRON et THELY [175], ont séparé d'extraits d'organes ou de thyroglobulines des produits de degrés d'ioduration diverses et pensent, de ce fait, avoir montré l'hétérogénéité de l'iodoprotéine thyroïdienne. Leurs conclusions ne sauraient être adoptées sans réserves, la pureté des préparations employées par ces auteurs et le caractère protéique de toutes les fractions iodées obtenues reste à démontrer. L'absorption d'acides aminés iodés ou d'ions iode à certaines de celles-ci peut en effet être à l'origine des faits observés. Néanmoins, il est très probable que le degré d'ioduration physiologique de la thyroglobuline peut subir des variations importantes et l'on peut envisager que le corps thyroïde d'un même animal renferme un mélange de protéines plus ou moins richement halogénées.

Il y avait intérêt à reprendre l'étude de la préparation de la thyroglobuline pour diverses raisons. D'une part, le contrôle de l'efficacité des moyens de purification adoptés jusqu'ici s'avère nécessaire pour établir une méthode permettant d'obtenir de la thyroglobuline pure et non dénaturée ; aucune des techniques actuelles n'offre de garanties à cet égard. D'autre part, la préparation de l'iodoprotéine thyroïdienne pure permettrait seule d'étudier avec sécurité le problème de l'unité ou de la multiplicité des thyroglobulines. Il convenait pour entreprendre ce travail de disposer de critères d'homogénéité ou d'hétérogénéité des milieux protéiques, et ni l'ultracentrifugation, ni l'électrophorèse n'avaient permis à cet égard une analyse fine des préparations obtenues par HEIDELBERGER et PALMER. Nous avons employé dans ce but le test de solubilité des protéines en fonction de la concentration en sels neutres élaborés par E. J. COHN [42, 43, 44, 45, 46, 47, 48] et appliqués sur une large échelle par ROCHE et DERRIEN [177, 178, 179, 180, 181], sous la forme récemment développée par DERRIEN [54]. L'établissement des diagrammes de solubilité en fonction de la concentration en protéines dans un milieu de teneur constante en sel neutre (NORTHROP [144]) a été mise en œuvre par ailleurs.

Certains problèmes devaient nécessairement être abordés à propos de ce travail en dehors du domaine technique. La teneur en iode des thyroglobulines s'est avérée variable (de 0,07 à 0,8 p. 100 selon OSWALD [145]) et de nombreux auteurs admettent avec HARRINGTON [67] que « cette variabilité seule suffit à indiquer que la thyroglobuline est mal définie et que,

même à l'heure actuelle, aucune preuve de l'isolement d'un produit homogène n'a été apportée ». Par contre HEIDELBERGER et PALMER [80], CAVETT Mac CLENDON et RICE [40], considérant que la pureté d'une thyroglobuline peut être appréciée au moyen de son taux en iode, les derniers auteurs ayant obtenu à partir d'animaux d'abattoir des préparations renfermant jusqu'à 0,69 p. 100 de celui-ci. En l'état de nos connaissances sur l'ioduration physiologique de la thyroglobuline, on peut penser que la fixation de l'halogène s'opère avec une intensité variable sur un produit de composition en acides aminés et de structure constantes. Il en découlerait que cette protéine est bien définie, à sa teneur en dérivés iodés près. Notre travail était susceptible d'apporter une contribution à la solution de ce problème. De plus l'étude des thyroglobulines de quatre mammifères (Bœuf, Cheval, Chien, Porc) devait permettre de préciser l'existence éventuelle de caractères spécifiques de celles-ci ; d'autres protéines, comme les hémoglobines présentant à cet égard une grande diversité.

Nous avons, dans une première série de recherches, défini et localisé les protéines iodées dans les extraits thyroïdiens. Nous avons ensuite préparé des thyroglobulines par les méthodes d'OSWALD, d'HEIDELBERGER et PALMER, de CAVETT et SELJESKOG et identifié dans celles-ci les impuretés ou les fractions dénaturées. Cette étude ayant précisé les facteurs de dénaturation et les caractères de solubilité de la thyroglobuline, nous avons élaboré une méthode de préparation de cette protéine pure non dénaturée, ce qui n'avait pas été réalisé auparavant. Un examen général des résultats obtenus a permis de définir la thyroglobuline au regard de critères chimiques, physico-chimiques et discuter le problème de son homogénéité.

II. — Recherches personnelles.

A. — TECHNIQUES.

Les préparations d'extraits thyroïdiens et de thyroglobuline ont été obtenus selon les techniques précisées plus bas à partir de glandes (*) de taille et de poids normaux (Bœuf 10-14 g,

(*) Nous remercions MM. les Vétérinaires des Abattoirs de Marseille en particulier le Docteur PLACIDI, d'avoir assuré le contrôle de l'état et de la taille des corps thyroïdes destinés à nos recherches et M. le Professeur MERCIER (Pharmacologie, Marseille), d'avoir bien voulu nous fournir les organes de chiens utilisés pour ce travail.

Cheval 8-12 g, Porc 12-14 g) sur des animaux sains ou de glandes de Chien.

Elles ont fait l'objet de recherches sur la solubilité de leurs constituants protéiques en fonction de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium ou en milieu équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à $pH = 6,5$ et à 22° , ou en sulfate de sodium à $pH = 6,5$ et à 37° , poursuivies selon les modalités réglées par Y. DERRIEN [53] (temps d'équilibre 20 heures à température réglée à $\pm 0,05^\circ$ pH défini à $\pm 0,05$ près. concentration en N protéique 0,8-1,4 Mg par cm^3). Les dosages d'azote protéique qu'elles ont comportés ont été opérés par microkjeldahl dans des conditions techniques rigoureuses ; l'erreur relative dont leur précision est entachée ne dépasse pas 0,5 p. 100, sauf en présence de sulfate d'ammonium. Dans ce dernier cas, l'application de la méthode d'A. ROCHE et MARQUET [176] a permis d'obtenir des résultats à 1 p. 100 près.

L'expression graphique des résultats de ces dosages a été pour chaque expérience, établie simultanément selon la représentation classique de la variation de la solubilité S (Mg N protéique dissous par cm^3) en fonction de la concentration en sel neutre C.

Dans le cas d'une protéine homogène, la courbe $s = f(c)$ est formée par un segment d'exponentielle tendant asymptotiquement vers l'ordonnée zéro (E. J. COHN). Dans le cas d'un mélange de protéines de solubilité différentes, ce mode de représentation graphique conduit au tracé d'une courbe discontinue, formée par une succession de segments raccordés par des points particuliers (ROCHE et DERRIEN [177]). Les courbes $s = f(c)$ se prêtent assez bien à la détermination quantitative des divers constituants d'un mélange protéique et permettent d'entreprendre le fractionnement rationnel de ce dernier [178, 179, 181, 127].

Afin d'alléger la présentation de ce travail, nous nous sommes bornés à y insérer une série de clichés sans y joindre de valeurs numériques. Ces figures rendant compte des résultats de nos recherches sont constituées dans chaque cas par la représentation du type de courbe décrit ci-dessus. Les valeurs de S définies plus haut ont été portées en ordonnées en fonctions des concentrations en sel C porté en abscisses. C est exprimé en p. 100 en volume de solution saline stock ($SO_4(NH_4)_2$ saturé., SO_4Na_2 à 25 g pour 100, mélange équimoléculaire de $(PO_4K_2H + PO_4KH_2$ 3,5 M). Cette définition des systèmes de

cordonnées adoptés ne sera pas répétée dans la légende de chaque figure, laquelle ne comporte que l'indication du produit étudié et des conditions de l'expérience. L'iode total a été dosé par les méthodes de LEIPERT [106] et de MICHEL et LAFON [135] et le phosphore total par la méthode de NEUMANN (technique de MOURGUE [139]) dans les extraits thyroïdiens ou leurs produits de fractionnement. Le contrôle du pH ($\pm 0,05$) a été opéré par potentiométrie (électrode de verre).

B. — ETUDES DES PROTÉINES DES EXTRAITS THYROÏDIENS.

La méthode d'HEIDELBERGER et PALMER [80] comporte dans un premier temps l'extraction à la presse de pulpe de corps thyroïde finement haché après lavage à l'eau glacée, cette opération étant répétée après mise en suspension de l'organe pressé dans une solution à 1 pour 100 d'acétate de sodium. Celle de CAVETT et SELJESKOG [41] extrait la thyroglobuline brute de coupes minces de l'organe congelé, par des solutions isotoniques de chlorure de sodium de $pH = 7,6$ (20 heures de contact à 0°). Nous avons comparé les produits obtenus par ces deux modes opératoires et étudié leur rendement.

Les protéines extraites par l'un ou l'autre procédé sur un lot homogène de corps thyroïde présentent une teneur en iode pratiquement identique, en général un peu plus élevé dans le produit obtenu selon CAVETT et SELJESKOG, par exemple, 0,254 p. 100 pour le premier et 0,269 p. 100 pour le second. Par contre, le rendement de l'opération est nettement supérieur avec la technique de ces derniers auteurs (40 pour 100 environ dans les conditions où nous nous sommes placés) et conduit à des milieux beaucoup moins riches en lipides. Dans les deux cas, l'extraction des glandes saines et de taille normale fournit des protéines de teneur en iode très diverses. Pareils écarts dans le taux de l'iode protéique ont été constatés par certains auteurs et non par d'autres ; ils tiennent probablement aux conditions alimentaires des animaux, mais aussi aux variations saisonnières de l'activité de l'organe. Les résultats obtenus à partir du corps thyroïde de porcs provenant d'élevage régionaux et d'animaux d'abattoir ou de laboratoire d'origine indéterminée ont été rassemblés dans le Tableau XX.

TABLEAU XX.

Teneur en iode pour 100 des protéines totales d'extraits thyroïdiens de divers animaux (glandes de taille normale).

Espèce animale et type d'extraction	Mois de prélèvement et Iode p. 100
Bœuf (CAVETT et SELJESKOG)....	novembre : 0,64 ; mars : 0,03.
Bœuf (HEIDELBERGER et PALMER)...	novembre : 0,72 ; janvier : 0,45.
Cheval (CAVETT et SELJESKOG)...	janvier : 0,40 ; janvier : 0,34.
Chien (CAVETT et SELJESKOG)....	mai-juin : 0,32.
Porc (CAVETT et SELJESKOG).....	novembre : 0,46 ; mai : 0,08.
Porc (HEIDELBERGER et PALMER)...	novembre : 0,59 ; décembre : 0,47 ; décembre : 0,33 ; février : 0,21 ; mars : 0,18 ; avril : 0,21 ; mai : 0,31 ; juin : 0,32 ; octobre : 0,39.

La solubilité en présence de sels neutres à concentration croissante des protéines que renferment ces extraits traduit leur hétérogénéité. Nous l'avons étudié sur environ cinquante préparations et l'on trouve ci-dessous (figures 8, 9, 10, 11, 12, 13) quelques exemples des résultats obtenus par les deux méthodes.

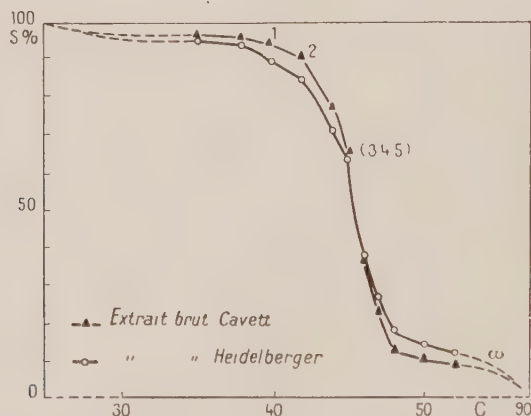


Fig. 8. — Extraits thyroïdiens bruts (Porc) préparés selon CAVETT et SELJESKÖG (I p. 100 = 0,27) et HEIDELBERGER et PALMER (I p. 100 = 0,25), à partir d'un même lot de glandes. Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ (C = p. 100 de solution 3,5 M de ce mélange), pH = 6,5, t = 22°.

La figure 8 illustre les résultats obtenus sur des extraits préparés par les techniques de CAVETT et SELJESKOG et d'HEIDELBERGER et PALMER sur un même lot de glandes de Porc et addi-

tionnés de quantités progressivement croissantes de mélanges équimoléculaires de phosphates mono- et dipotassique 3,5 M, de $pH = 6,5$ à 22° .

Son examen rend compte que les deux types de préparations renferment en abondance un groupe de constituants protéiques dont le relargage a lieu entre les teneurs de 42 à 48 p. 100 des solutions en mélange de phosphates de potassium 3,5 M dans les conditions opératoires adoptées. Par ailleurs, le second est plus riche en fractions protéiques, les unes plus solubles et les autres moins solubles que celles-ci.

Les figures 9 à 13 établies à l'aide d'un plus grand nombre de déterminations, sont à cet égard plus significatives. L'hétérogénéité protéique qu'elles mettent en évidence est indépendante de l'origine animale des extraits et de la nature du sel précipitant. On le retrouve en effet lors du relargage par les phosphates alcalins, par le sulfate de sodium et par le sulfate d'ammonium (figures 9, 10). Elle se manifeste identiquement quelle que soit la richesse en iode des extraits et n'est pas modifiée par la délipidation au toluène, qui doit dès lors être considérée comme un solvant des lipides dont l'emploi ne comporte aucune dénaturation (figure 13). Les courbes de S en fonction de C sont constituées par un certain nombre de segments successifs séparés par des points particuliers correspondant au début de précipitation d'un constituant (ou groupe de constituants) plus soluble que le précédent. La position des points particuliers est pratiquement identique sur les divers graphiques dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés. (Il est particulièrement important de respecter la concentration des milieux en protéine, voisine de 1,2-1,4 pour 100 N protéique par cm^3 dans nos expériences, pour que la position de ces points conserve une signification. Une dilution des solutions protéiques provoque un léger décalage des courbes vers les concentrations plus élevées en sel). Nous avons numéroté de 1 à 5 les diverses fractions qu'ils délimitent. La première de celle-ci (1) représente les fractions de plus faible solubilité, le taux de la seconde (2) est très variable. Les trois dernières 3, 4 et 5 constituent seules, comme on le verra plus bas, la thyroglobuline, car elles renferment la quasi totalité de l'iode. L'ensemble des fractions protéiques précipitant ensuite a été désigné par ω . On remarquera que leur taux respectif est variable d'une préparation à l'autre et qu'une de ces fractions peut être fusionnée avec une autre lorsque celle-ci est beaucoup

plus abondante. Par ailleurs nous avons constaté que la conservation des extraits et leur dilution provoquent des modifications du même ordre.



Fig. 9. — Extrait thyroïdien brut (Bœuf) préparé selon HEIDELBERGER et PALMER (I p. 100 = 0.45). Solubilité (S) en présence de sulfate de sodium (C = p. 100 de solution à 25 g p. 100 ml en ce sel) pH = 6.5, t = 37°.

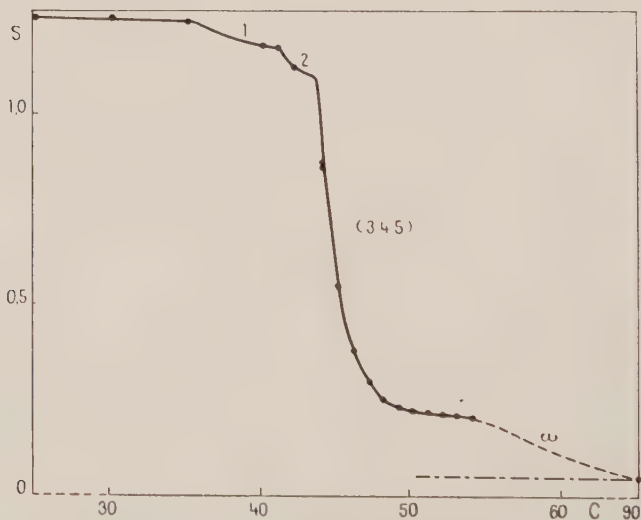


Fig. 10. — Extrait thyroïdien brut (Cheval) préparé selon HEIDELBERGER et PALMER (I p. 100 = 0.40). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ (C = p. 100 de solution 3.5 M de ce mélange), pH = 6.5, t = 22°.

En définitive, les fractions thyroglobulines constituent dans les extraits bruts étudiés de 60 à 80 p. 100 des protéines. Les limites de solubilité de ces produits dans une marge de concentration en divers sels neutres sont assez bien définies et

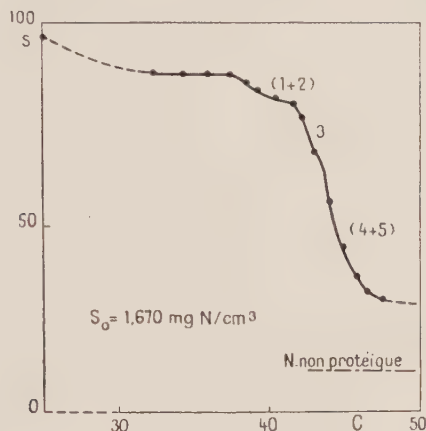


Fig. 11. — Extrait thyroïdien brut (Porc) préparé selon HEIDELBERGER et PALMER (I p. 100 = 0.08). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH} + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ (C = p. 100 de solution 3.5 M de ce mélange), pH = 6.5, t = 22°.

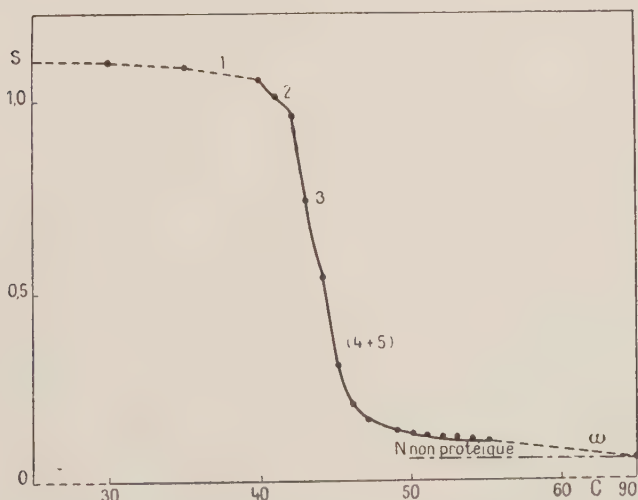


Fig. 12. — Extrait thyroïdien brut (Porc) préparé selon CAVETT et SELJESKÖG (I p. 100 = 0.24) ; Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ (C = p. 100 de solution 3.5 M de ce mélange), pH = 6.5, t = 22°.

constantes dans certaines conditions opératoires (42-48 p. 100 de mélange équimoléculaire des phosphates mono et dipotassique, 36 à 42 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium, à $pH = 6,5$ et à 22° , 66 à 73 p. 100 de la teneur en solution de sulfate de sodium à 25 g. pour 100, à $pH = 6,5$ et à 37° dans les milieux renfermant de 1,0 à 1,5 Mg N protéique par cm^3). Elles sont à cet égard identiques quelle que soit leur teneur en iode et leur origine animale. Aussi, le relargage par les sels

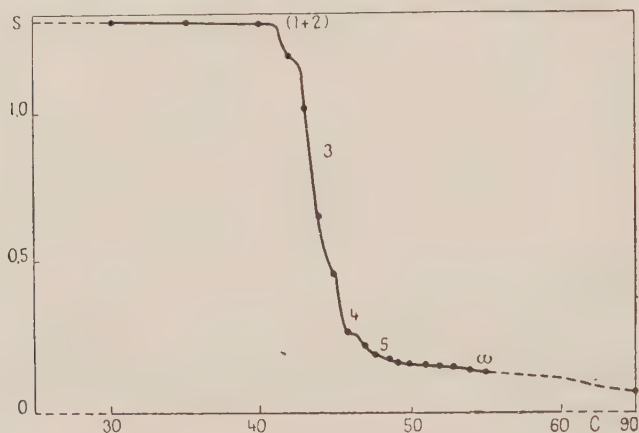


Fig. 13. — Extrait thyroïdien brut (Porc) préparé selon HEIDELBERGER et PALMER, délipidé au toluène (I p. 100 = 0.48). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire $PO_4KH_3 + PO_4K_2H$ (C = p. 100 de solution 3.5 M de ce mélange), $pH = 6.5$, $t = 22^\circ$.

neutres n'amenant aucune dénaturation, son application à la préparation de la thyroglobuline pure trouve-t-il une première base expérimentale dans nos résultats.

C. — ELIMINATION DES IMPURETÉS PROTÉIQUES, DÉNATURATION ET PRÉPARATION DE LA THYROGLOBULINE.

HEIDELBERGER et PALMER [80] ont les premiers attiré l'attention sur l'existence dans les extraits thyroïdiens d'impuretés protéiques accompagnant la thyroglobuline et montré que la précipitation acétique de celle-ci opérée par OSWALD [145] entraîne sa dénaturation partielle. La figure 14 établie à partir des courbes de relargage par le sulfate de sodium à $pH = 6,5$ et à 22° , de la thyroglobuline obtenue par la méthode d'OSWALD et de protéines totales de l'extrait thyroïdien (Porc) ayant servi de matière première à la préparation de celle-ci est

à cet égard significative. Son examen montre en effet que les protéines thyroïdiennes séparées de l'extrait par précipitation isoélectrique sont dénaturées et transformées en produits *a*, *b* et *c*, précipitant par le sulfate de sodium à des concentrations en celui-ci beaucoup plus faible, entre 20 et 50 p. 100 de la saturation à *pH* 6,5 et à 37° au lieu de 66 et 75 p. 100.

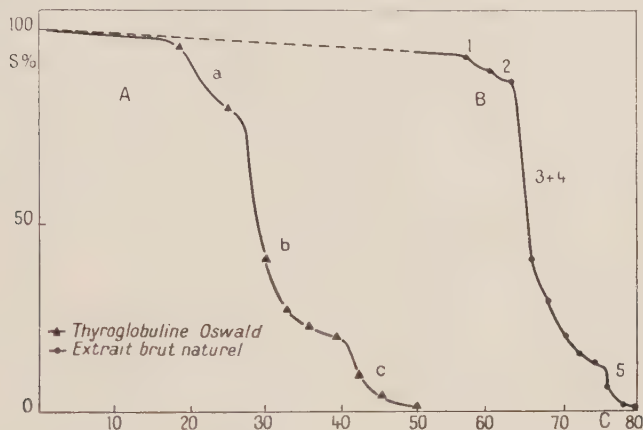


Fig. 14. — A. Thyroglobuline préparée par la méthode d'Oswald (Bœuf).
B. Extrait brut naturel.

Solubilité en présence de sulfate de sodium (C = p. 100 de la saturation en SO_4Na_2) *pH* = 6,5 et à 37°C.

HEIDELBERGER et PALMER [80] ont établi que les extraits bruts de corps thyroïde renferment un nucléoprotéide que n'élimine pas la méthode d'OSWALD, et pour HEIDELBERGER et PEDERSEN [81], la dénaturation de la thyroglobuline serait liée à sa précipitation isoélectrique (*pH* = 4,48), cette protéine étant très instable aux *pH* inférieurs à 5,0. Les premiers auteurs ont proposé de séparer le nucléoprotéide par précipitation à *pH* = 4,8-5,0, puis de précipiter la thyroglobuline par le sulfate de sodium à demi-saturation. Nous avons répété la préparation décrite par HEIDELBERGER et PALMER et étudié la solubilité de la protéine obtenue en présence d'un mélange phosphates mono- et dipotassique 3,5 M à concentration croissante. Les graphiques reproduits sur la figure 15 illustrent les résultats obtenus.

La fraction 1 de l'extrait brut de corps thyroïde est bien éliminée par le traitement préalable de celui-ci à *pH* = 4,9, mais la solubilité d'une partie de la thyroglobuline régresse

alors notablement, ce qui traduit l'apparition de constituant précipitant à des concentrations en sels inférieures à celles auxquelles commence le relargage des fractions 3, 4 et 5 des protéines totales. De plus, la fraction 2 n'est probablement pas éliminée; il se peut néanmoins que le constituant précipitant dans la même zone au cours de l'expérience soit de la thyroglobuline faiblement dénaturée. Nous avons cherché à éviter

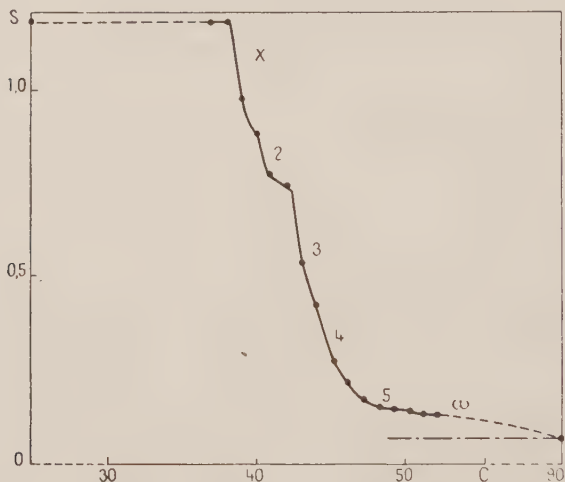


Fig. 15. — Thyroglobuline de Porc préparée par la méthode d'HEIDELBERGER et PALMER (I p. 100 = 0.56). Solubilité (S) en présence de mélange équimoléculaire de solution 3.5 M $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_3\text{H}$ (C = p. 100 de ce mélange), pH = 6.5, t = 22°.

cette modification de l'iodoprotéine en séparant le nucléoprotéide présent dans les extraits bruts à des pH supérieurs à 4,8-4,9. L'acidification de solutions à pH = 5,2 provoque une précipitation des impuretés protéiques faiblement solubles sans altérer la thyroglobuline, laquelle conserve sa solubilité naturelle ; mais les produits obtenus renferment encore des quantités appréciables des fractions 1 et 2. Il en découle que le procédé d'HEIDELBERGER et PALMER doit être abandonné.

La méthode de CAVETT et SELJESKOG évite judicieusement toute acidification et isole la thyroglobuline en la précipitant entre 35 et 45 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium. La protéine préparée selon le mode opératoire décrit par ces auteurs, en ayant soin de maintenir le pH à 6,5 pendant le re-

largage, présente des caractères de solubilité dont rend compte l'examen de la figure 16.

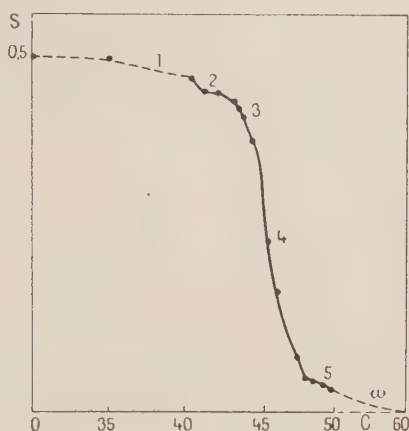


Fig. 16. — Thyroglobuline de Porc préparé par la méthode de CAVETT et SELJESKÖG (I p. 100 = 0.30). Solubilité (S) en présence d'un mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ (C = p. 100 de solution 3.5 M de ce mélange). pH = 6.5, t = 22°.

La thyroglobuline des auteurs américains ne renferme que des constituants protéiques de même solubilité que ceux présents dans les extraits bruts. Mais le fractionnement de ces protéines est alors très incomplet, puisque l'on y trouve en dehors de la thyroglobuline [3, 4, 5] une partie des fractions de tête (1 et 2), et, une impureté de queue, plus soluble que le constituant 5. Il n'y a pas lieu de considérer ce produit comme pur. Il a d'ailleurs été possible de le fractionner et de démontrer que seules les fractions 3, 4, 5 des extraits bruts qu'il renferme constituent la thyroglobuline. La figure 17 illustre les résultats d'une expérience que nous avons réalisée dans ce but.

Le fractionnement opéré à concentration de 44,5 p. 100 en solution 3,5 M de phosphates potassiques a permis de séparer 23,0 p. 100 de protéines précipitées (B), 77,0 p. 100 du produit (C) demeurant en solution. Les constituants les moins solubles sont ainsi concentrés dans B, riches en fractions 2 et 3, pauvres en 4 et dépourvus de 5. L'apparition de fraction 1 est sans doute due à la concentration de celle-ci, dont la préparation initiale ne renferme que 1 pour 100 environ.

Le produit C renferme, par contre, presque exclusivement

les fractions 4 et 5 de la préparation initiale, avec une trace de fraction 3. Or, la teneur en iode de B est 0,10 p. 100, celle de C de 0,34 p. 100 et celle de la préparation non fractionnée 0,305 p. 100. Si l'on rapporte la totalité de l'iode aux constituants 3, 4, 5 et si l'on calcule le degré diioduration que ceux-ci présentent dans les trois produits étudiés, déterminant leur

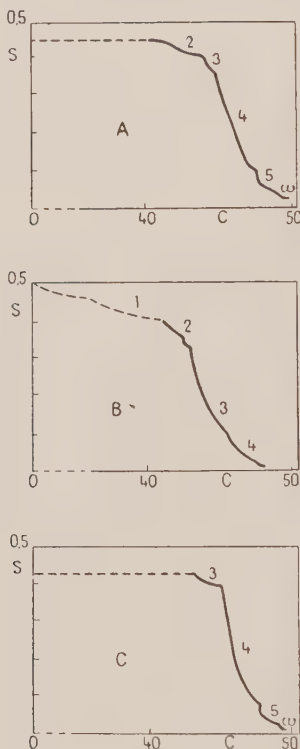


Fig. 17. — A. Thyroglobuline de Porc préparée par la méthode de CAVETT et SELJESKÖG (I p. 100 = 0.30). B. Même produit fractionné à une teneur de 44.5 p. 100 en mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 3.5 M, *fraction précipitée* (I p. 100 = 0.19). C. Même produit fractionné à une teneur à 44.5 p. 100 du mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 3. M, *fraction soluble* (I p. 100 = 0.34). Solubilités (S) en présence d'un mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 3.5 M (C = p. 100 de solution 3.5 M de ce mélange), pH = 6.5, $t^\circ = 22^\circ$.

taux respectifs, déterminés graphiquement sur les courbes ci-jointes, on obtient une valeur de 0,36 p. 100. Il en découle que le produit obtenu par la méthode de CAVETT et SELJESKOG renferme des fractions protéiques non iodées [1 et 2], et que la

thyroglobuline en constitue uniquement les fractions 3, 4, 5 individualisées sur les courbes de solubilité des extraits thyroïdiens comme sur celles des préparations de CAVETT et SELJESKOG. Le procédé de ces auteurs est donc supérieur à celui de HEIDELBERGER et PALMER en ce sens qu'il conduit à une thyroglobuline non dénaturée, mais celle-ci est souillée d'impuretés protéiques dont le taux est en général égal ou supérieur à 10 p. 100.

D. — RÉPARTITION DE L'IODE DANS LES EXTRAITS THYROÏDIENS ET PRÉPARATION DE LA THYROGLOBULINE PURE.

La précipitation fractionnée par les sels neutres doit sans conteste être considérée, à la suite des résultats exposés plus haut, comme le principe à retenir pour séparer des extraits thyroïdiens, la thyroglobuline non dénaturée. Néanmoins, les conditions de son application demeuraient à déterminer. Il convenait pour cela d'étudier systématiquement le relargage de la thyroglobuline et des impuretés protéiques qui l'accompagnent dans les extraits obtenus selon CAVETT et SELJESKOG en mettant à profit les particularités de composition de l'une et des autres.

La thyroglobuline est iodée, et les impuretés qui l'accompagnent dans des produits bruts ne le sont pas, l'une d'elles étant un nucléoprotéide. Aussi pouvait-on espérer préciser les limites des concentrations en sels neutres entre lesquelles s'opère le relargage de ces divers corps en étudiant la précipitation de l'azote protéique de l'iode et du phosphore des extraits additionnés de ces sels à des taux progressivement croissants. Une expérience de ce type a été réalisée sur une série d'échantillons d'un extrait thyroïdien de Porc renfermant 11,40 Mg de protéines totales ; 0,0429 Mg I et 0,025 Mg P par cm³. Les divers échantillons de même volume (100 cm³) renfermaient des quantités progressivement croissantes de sulfate d'ammonium (écarts de 1 en 1 pour 100 de la saturation en sel), et leur pH contrôlé à l'électrode de verre était de 6,5. Après 20 heures d'équilibre à 22°, une prise d'essai du liquide recouvrant les précipités a été séparée et centrifugée et l'on y a dosé l'azote protéique, l'iode et le phosphore total après avoir fait subir à trois parties aliquotes les minéralisations appropriées. Le taux des protéines solubles ou précipitées et la teneur en iode et le phosphore de celles-ci a été calculé à partir des résultats. On trouvera dans le tableau XXI les plus significatifs de ceux-ci.

TABLEAU XXI.

Précipitation des fractions iodées et phosphorées des protéines d'un extrait thyroïdien de Porc (CAVETT et SELJESKOG) par le sulfate d'ammonium à concentration croissante, pH = 6,5, t = 22°.

Marge de concentration en sulfate d'ammonium dans laquelle la précipitation a lieu	P. 100 de l'azote protéique précipité entre ces limites	Teneur en I p. 100 des protéines précipitées	Teneur en P p. 100 des protéines précipitées
De 30,0 à 32,5 ...	1,16	traces indos.	0,395
De 32,5 à 35,0 ...	2,79	traces indos.	
De 35,0 à 36,0 ...	4,19	0,13	0,482
De 35,0 à 37,0 ...	12,81	0,374	0,000
De 37,0 à 38,0 ...	24,23	0,482	0,000
De 38,0 à 39,0 ...	22,26	0,454	0,072
De 39,0 à 40,0 ...	12,46	0,464	0,226
De 40,0 à 41,0 ...	3,26		
De 41,0 à 42,0 ...	2,44	0,375	0,366
De 42,0 à 43,0 ...	0,93		
De 43,0 à 44,0 ...	0,82	0,091	0,434
De 44,0 à 45,0 ...	1,22		
De 45,0 à 47,5 ...	2,74		
De 47,5 à 50,0 ...	2,16	0,0114	0,441

Environ 75 p. 100 des protéines iodées d'extrait thyroïdien précipitent entre 36 et 40 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium à pH = 6,5 à 22°. Par contre le nucléoprotéide s'insolubilise dans les fractions de tête et les fractions de queue moins abondantes renferment du phosphore probablement lipoprotéidique. Comme la séparation d'une protéine dans un mélange comporte toujours l'entraînement d'autres dans les zones de salinité où elle commence et où elle s'achève, on pouvait espérer obtenir la thyroglobuline pure en opérant deux fractionnements successifs entre 36 et 41 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium. Le premier a été conduit sur les protéines totales des extraits d'organe, le second sur le produits de la première opération repris par une solution à 36 p. 100 de sulfate d'ammonium et centrifugé pour en éliminer les produits insolubles et les résultats obtenus ont été mis à profit pour établir le mode opératoire permettant de préparer la thyroglobuline pure.

Préparation de la thyroglobuline pure.

1 kg de corps thyroïdes normaux de Porcs sont congelés et coupés au rasoir en tranches minces (0,8-1,5 mm), puis mis en suspension dans 3 litres de solution à 0,9 p. 100 de chlorure de sodium glacée et abandonné 24 heures à $+2^{\circ}$ C. On filtre sur gaze. On centrifuge le filtrat pour éliminer le précipité et l'on enrichit en sel neutre par addition d'un volume convenable de solution saturée en celui-ci jusqu'à 42 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium. Après 12 heures de séjour à 20° C, le précipité formé est séparé par centrifugation. On le met en suspension dans 2 litres 800 d'une solution de sulfate d'ammonium à 42 p. 100 de la saturation, puis il est ramené à 37 p. 100 de celle-ci par addition d'eau. On centrifuge 12 heures après les protéines insolubles que l'on élimine. La solution est enrichie en sel jusqu'à une teneur égale à 41 p. 100 de la saturation. Le précipité formé est mis en suspension dans du sulfate d'ammonium à 41 p. 100 de la saturation et l'on centrifuge. La solution est ainsi débarrassée successivement des fractions solubles à 41 et de celles insolubles à 37 p. 100 de la saturation en sel adsorbées au produit de la première séparation. Elle renferme la thyroglobuline pure non dénaturée. Celle-ci peut être précipitée par l'alcool ou l'acétone de ses solutions après élimination de ses sels par dialyse, si la préparation est destinée à l'analyse chimique. Les solutions dialysées peuvent être utilisées pour des recherches physicochimiques à condition d'être conservées à des pH supérieurs à 5,0-5,2, de préférence à pH = 6,5-7,0.

Le mélange équimoléculaire de phosphates mono- et dipotassique 3,5 M à pH = 6,5 peut être substitué à la solution saturée de sulfate d'ammonium dans cette série d'opérations. Il convient seulement alors de ce placer pour les fractionnements entre 43 et 48 p. 100 de la teneur en solution 3,5 M de phosphates de potassium en opérant selon des modalités identiques pour réduire au minimum les adsorptions : lavage du précipité à 48 p. 100, élimination de la solution, addition d'eau jusqu'à 43 p. 100, puis après centrifugation du précipité, traitement de la solution par 48 p. 100, isolement du précipité, remise en solution à 43 et centrifugation. L'examen de la figure 18 permet d'apprécier l'efficacité de la purification en se basant sur l'étude de la solubilité de la thyroglobuline dans un extrait brut et après sa séparation.

Les produits obtenus dans les deux cas sont identiques au regard de leur critère de solubilité et de leur teneur en iode,

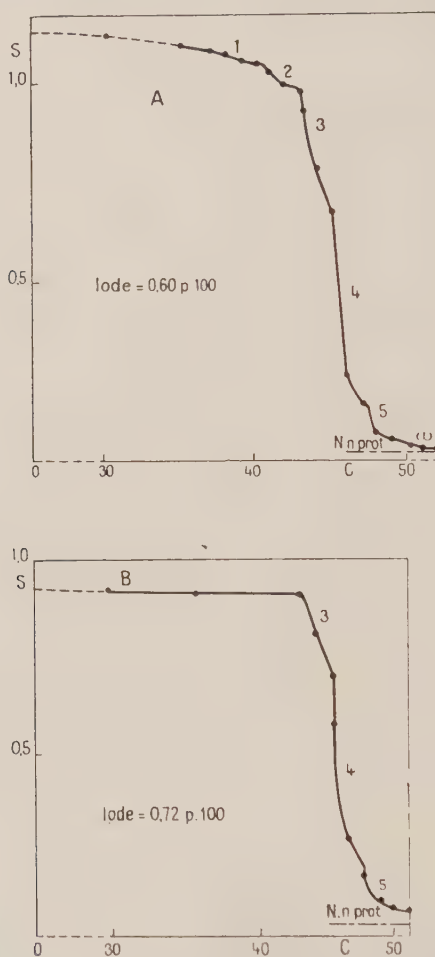


Fig. 18. — A. Extrait thyroïdien brut (Pore). B. Thyroglobuline pure préparée par notre méthode. Solubilité (S) en présence d'un mélange équi-moléculaire de phosphates mono- et dipotassique (C = p. 100 de ce mélange 3.5 M (pH = 6.5, t = 22° C.

celle-ci étant fonction du matériel de départ. La méthode aux phosphates présente l'avantage d'éviter tout contrôle du pH et tout risque d'acidification, en raison du pouvoir tampon élevé des milieux ; mais les précipités protéiques se formant en milieu phosphate sont plus ténus que ceux prenant naissance en présence de sulfate d'ammonium et il convient de disposer

pour les séparer d'une centrifugeuse assez rapide (6.000 tours par minute).

La disparition des constituants protéiques 1 et 2 et de la fraction de queue plus soluble que le constituant 5 est totale lorsque l'on passe du produit A à B. Seuls des constituants 3, 4, 5 demeurent et conservent leurs caractères de solubilité. La preuve qu'ils correspondent bien à la thyroglobuline est apportée par l'étude de la précipitation de l'azote protéique et de l'iode total des préparations purifiées, des concentrations

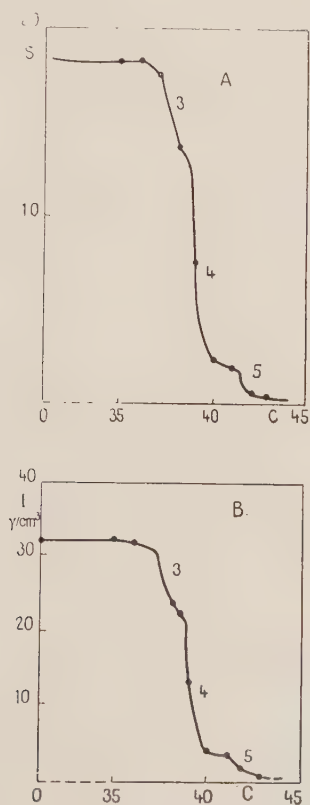


Fig. 19 .— Thyroglobuline pure de Porc préparée par notre méthode (I p. 100 = 0.275). Solubilité (S) en présence de sulfate d'ammonium à concentration croissante (C = p. 100 de la saturation en ce sel), pH = 6.5, t = 22°. A. Variation de S en Mg d'azote protéique dissous par cm³. B. Variation de I en µg d'iode dissous par cm³.

croissantes en sels neutres. La figure 19 résume les résultats d'une expérience poursuivie dans ce but en utilisant le sulfate d'ammonium comme agent de relargage.

Dans toute la marge de précipitation de la protéine, l'expérience montre donc qu'il existe une proportionnalité rigoureuse entre l'insolubilisation des protéines et celle de l'iode, le rapport N/I demeurant constant dans les fractions solubles et dans les fractions précipitées aux diverses concentrations en sels. Il en découle que la composition chimique du produit séparé d'extrait thyroïdien que nous considérons comme la thyroglobuline pure est homogène. Cette conclusion est corroborée par le fait que les courbes A et A', B et B' présentent le même nombre de fractions caractérisées par la position des points particuliers dans A et B et par celle de leur sommet dans A' et B' aux mêmes concentrations en sels.

La teneur en azote de ces produits est $N \text{ p. } 100 = 15,8$; ils sont rigoureusement dépourvus de phosphore alors que ceux préparés par CAVETT, RICE et Mac CLENDON [40] en contiennent de petites quantités. Certaines de nos préparations étaient plus riches en iode que toutes celles obtenues jusqu'ici sur des organes d'animaux de même espèce, la valeur de $0,84 \text{ p. } 100 \text{ I}$ étant la plus élevée que nous ayons observée. Toutefois, la teneur en iode de ces produits est variable. La régularité des caractères de solubilité de la thyroglobuline s'oppose à la variabilité de son taux d'iode. A cet égard, l'hétérogénéité des produits purs, identique à celle de fractions correspondant à la thyroglobuline dans les extraits d'organes ne saurait être mise en doute. Etant donné que la précipitation de cette protéine s'opère dans les limites assez étroites de concentration en sels, on pouvait penser que la distinction des fractions 3, 4 et 5 était quelque peu artificielle. C'est pourquoi il a paru utile de contrôler son existence sur un critère autre que celui tiré des courbes de solubilité en fonction de la concentration en sels neutres. Nous l'avons fait en établissant le diagramme de solubilité des préparations pures à concentration constante en sel neutre et à concentration variable en protéine selon NORTHROP [144]. Les résultats obtenus en présence d'un mélange équimoléculaire $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ $1,54 \text{ M}$ à $\text{pH} = 6,5$ à 24° ont été reproduits dans la figure 20.

Les deux tests auxquels nous avons fait appel pour étudier l'hétérogénéité de la thyroglobuline pure concordent donc pour démontrer l'existence dans cette protéine de 3 fractions distinctes par leur solubilité, et cela malgré l'uniformité de teneur en iode de celles-ci et la constance du rapport N/I dans l'une et l'autre. L'étude de la composition en acides aminés des

thyroglobulines préparées par la méthode ainsi décrite a permis par ailleurs de définir ces produits en se basant sur des critères chimiques. Nous en exposerons dans le prochain cha-

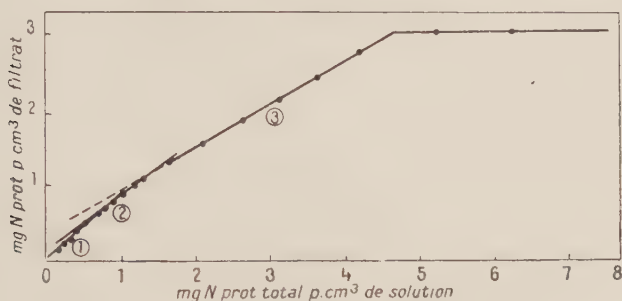


Fig. 20. — Solubilité de la thyroglobuline pure préparée par notre méthode (I p. 100 = 0,34) à concentration croissante en protéine dans des milieux de teneur en phosphates mono- et dipotassique constante (1,54 M), p H = 6,5, t = 24°.

pitre les résultats et examinerons à leur propos sur quelles bases il est légitime de faire reposer la définition de la thyroglobuline pure.

III. — Discussion des résultats.

En dehors de la préparation de la thyroglobuline pure, sur laquelle il n'y a pas lieu de revenir, les résultats obtenus méritent d'être discutés pour en dégager une définition précise de cette protéine en ce qui concerne son homogénéité chimique et physicochimique.

A. — TENEUR EN IODE ET PURETÉ DE LA THYROGLOBULINE.

Une certaine confusion règne en ce qui concerne la teneur en iode de cette protéine. Divers auteurs ont admis que les produits les plus riches en iode obtenus jusqu'ici sont les plus purs. Pour d'autres, le corps thyroïde renfermerait un mélange de protéine différant entre elles par leur degré d'ioduration. Aucune des deux opinions ne paraît devoir être retenue à la suite de notre travail.

En effet, les caractères de solubilité de la thyroglobuline sont indépendants de son degré d'ioduration. Certaines de nos préparations ont une teneur en iode supérieures à la plus élevée signalée par les auteurs antérieurs (jusqu'à 0,84 p. 100 I au

lieu de 0,69 p. 100 [40]). Or, elles présentent les mêmes caractères de solubilité que les produits peu iodés (0,1 p. 100 I) préparés par la même méthode en partant de glandes pauvres en halogène. Par ailleurs, comme nous l'établirons par la suite la composition en acides aminés non iodés de thyroglobuline pure de teneurs en iode diverses provenant de glandes normales est constante. Il en découle que la *teneur en iode d'une thyroglobuline ne permet pas de définir son degré de pureté*. Le mécanisme biologique de la formation des acides aminés dans le corps thyroïde légitime indirectement cette manière de voir. Les travaux poursuivis depuis 15 ans dans ce domaine par les Ecoles anglaises et américaines permettent de penser avec HARRINGTON [68] [69], avec CHAIKOFF [58] [138] et leurs collaborateurs que la biosynthèse de la diiodotyrosine et de la thyroxine s'opère au sein de la molécule de thyroglobuline comme elle a lieu *in vitro* par action de l'iode sur les protéines [115]. S'il en est ainsi, l'organe doit sécréter une protéine de composition et de structure constantes dont l'halogénéation ultérieure est fonction de processus autonomes indépendants de la formation proprement dite de la protéine. Dès lors les seuls critères de pureté de celle-ci auquel on est en droit de s'adresser pour la caractériser sont sa composition en acides aminés non iodés — la diiodotyrosine et la thyroxine ne constituant par ailleurs jamais qu'une fraction minime de la molécule — et ses propriétés physicochimiques, mais non sa teneur en halogène ou en combinaisons halogénées. C'est pourquoi, nous considérons la protéine séparée des extraits thyroïdiens comme la thyroglobuline pure car ses caractères de solubilité et sa teneur en acides aminés non iodés [35] sont rigoureusement constants malgré la variabilité de la teneur en iode des préparations. Il n'existe à cet égard aucune différence entre les thyroglobulines de divers mammifères (Bœuf, Cheval, Chien, Porc) contrairement à ce que l'on observe pour les hémoglobines et les myoglobines dont la composition et la solubilité varient dans de très larges limites. De fait, les concentrations salines entre lesquelles les extraits glandulaires bruts des animaux d'abattoir ou de laboratoire étudiés sont identiques dans les conditions indiquées plus haut.

B. — SUR L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA THYROGLOBULINE.

Aucun des essais thyroïdiens ne renfermait une iodoprotéine précipitant à la manière d'un produit homogène et les frac-

tions caractérisant la thyroglobuline dans les produits bruts ont été individualisées sur les courbes de solubilité par des segments de courbes délimités par des points particuliers.

L'interprétation de ces faits est hypothétique sauf sur un point. Il est pratiquement certain que l'existence de fractions de solubilité diverse ne traduit pas celle d'un mélange de thyroglobulines car la teneur en iode et en acides aminés de toutes celles-ci est identique. Par ailleurs, les caractères de solubilité des protéines thyroïdiennes sont pratiquement identiques dans presque tous les cas étudiés, la proportion des constituants n'est pas constante. Elle varie d'un extrait à l'autre et d'un de ceux-ci à la thyroglobuline que l'on en sépare. Elle peut par ailleurs se modifier en fonction de la dilution d'une préparation et certaines fractions font parfois défaut. Il paraît légitime d'admettre en première approximation que l'hétérogénéité se manifestant ainsi répond à l'existence de divers états d'agrégation d'une même protéine. Or, comme nous l'avons établi avec K. O. PEDERSEN (résultats non publiés) nos préparations sont homogènes à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse opérées sur des solutions protéiques de faible molarité en sels neutres. Tel est aussi le cas pour les produits partiellement dénaturés d'HEIDELBERGER et PALMER [80] étudiés par HEIDELBERGER et SVEDBERG [82], HEIDELBERGER et PEDERSEN [81] et par LUNDGREN [120]. Le dernier auteur a longuement insisté sur le fait que la thyroglobuline est susceptible de s'associer réversiblement en particules dont il a pu distinguer jusqu'à quatre types sous l'action de facteurs modifiant son ionisation. Il est probable que des phénomènes d'association moléculaire en milieu riche en sels neutres doivent être invoqués pour expliquer l'hétérogénéité des préparations que nous avons observée. Par ailleurs, puisque celles-ci sont chimiquement homogènes au regard de leur teneur en iode et en acides aminés iodés, il est très peu probable qu'il existe dans ces produits un mélange de thyroglobulines. On peut physiologiquement concevoir que toutes les molécules de celles-ci présentes dans les vésicules colloïdes ne soient pas uniformément iodées, mais que leur structure soit identique. S'il en était ainsi, la thyroglobuline telle que nous la définissons par des caractères physicochimiques précis et, comme nous le verrons, par sa composition constante en acides aminés non iodés serait constituée par un mélange de fractions d'une même protéine plus ou moins halogénées. En l'état actuel de la technique biochi-

mique, de tels mélanges sont encore indissociables et, même si leur existence doit être envisagée, la thyroglobuline dont nous avons décrit la préparation dans ce travail peut, en première approximation, être considérée comme une protéine pure.

II^e CHAPITRE.

Propriétés de la thyroglobuline.

I. — Travaux antérieurs.

Les thyroglobulines se distinguent de toutes les autres protéines extraites des organismes des mammifères par la présence d'iode dans leur molécule. HEIDELBERGER et PALMER [80] considèrent d'abord que les thyroglobulines pures doivent comporter un taux constant d'halogène, leur produit présentant une teneur voisine de 0,6 pour 100 I. Cependant, bien qu'opérant sur des produits plus purs CAVETT et ses coll. [39] [40] ont montré que les teneurs de thyroglobuline en iode sont variables et comprises entre 0,2 et 0,7 pour 100. Ces différences, admises également par HARRINGTON [67] sont dans une très large mesure fonction de la quantité d'iode présente dans le régime alimentaire.

La composition en acides aminés des préparations de thyroglobuline a fait l'objet d'un certain nombre de travaux. Deux problèmes principaux se sont posés au cours de son étude : l'existence de modifications de la composition en acides aminés non iodés en fonction de l'origine zoologique des organes et d'états pathologiques, et celle de variations de la teneur de la protéine en constituants halogénés. Les taux respectifs de la thyroxine et de la diiodotyrosine — produits dont le squelette organique représente moins de 50 p. 100 de la molécule — n'atteignant jamais 1 pour 100, on peut se demander si leurs écarts vont ou non toujours de pair avec des variations d'intensités du mécanisme physiologique d'ioduration, ou avec des modifications fondamentales de composition de la thyroglobuline.

BRAND, KASSEL et HEIDELBERGER [35], opérant sur trois échantillons de thyroglobulines de porc, préparés selon la méthode d'HEIDELBERGER et PALMER [80], et de taux d'iode total divers, ont déterminé leur teneur en thyroxine et en diiodotyrosine. Les résultats obtenus, rassemblés ci-dessous, traduisent

la présence constante d'un excès de diiodotyrosine en dépit d'écarts importants dans la richesse en iode total.

Préparation n ^o	I. Total p. 100	Thyroxine p. 100	Diiodotyrosine p. 100
I	0,425	0,25	0,44
II	0,360	0,24	0,34
III	0,142	0,03	0,20

A la vérité, il est difficile de définir d'après ces données et un petit nombre d'autres existant dans la littérature, si le rapport entre les teneurs en thyroxine et en diiodotyrosine ou entre les taux de thyroxine et d'iode total — ce qui est équivalent puisqu'il n'existe que des traces d'iode minéral dans les extraits thyroïdiens, et que l'on n'en trouve pas dans les préparations de thyroglobuline — est ou non assez peu variable. En dehors des données citées plus haut, d'autres établies par des méthodes de dosage différentes ont conduit à admettre que le rapport I thyroxinien/I total, est voisin de 0,5 à l'état normal pour HARINGTON et RANDALL [75] pour CUNY et ROBERT [49] et pour CAVETT, RICE et MAC CLENDON [40], de 0,3 pour BLAU [21] et de 0,2 pour LELAND et FOSTER [107]. Pour PARKES [153] l'activité des poudres de thyroïdes sur la métamorphose des amphibiens est proportionnelle à leur teneur en iode total, aussi bien qu'à leur teneur en iode thyroxinien.

CAVETT, RICE et MAC CLENDON [40], CAVETT [39] ont entrepris l'étude de nombreuses préparations de thyroglobuline humaine. Leurs recherches ont été poursuivies sur des organes normaux provenant de sujets n'ayant reçu aucune médication iodée et sur des corps thyroïdes de sujets porteurs de goîtres de divers types (colloïdal, adénomateux, exophtalmique). Elles ont comporté à la fois des dosages d'acides aminés iodés, mais aussi d'autres, parmi lesquels la tyrosine que l'on peut à bon droit considérer comme le précurseur des premiers. Il semble que dans les divers types de goîtres, la modification de la teneur en thyroxine soit plus marquée que celle de la teneur en diiodotyrosine, en sorte que tout se passe comme si la formation de la première aux dépens de la seconde était alors gênée. Toutefois, le défaut de spécificité de la méthode de dosage employé rend incertaine la discussion de faits observés. En outre, il existe une certaine correspondance entre les taux de tyrosine d'une part et ceux de diiodotyrosine et de thyroxine d'autre part. Comme le fait remarquer CAVETT, la protéine extraite de goîtres colloïdaux est légèrement plus riche en tyrosine et plus pauvre en dérivés iodés que celle des organes normaux, tan-

dis que l'excès de diiodotyrosine de la thyroglobuline des goîtres exophtalmiques va de pair avec sa pauvreté relative en tyrosine. Aucune variation importante du taux des autres acides aminés n'ayant été mise en évidence, on peut admettre que dans les divers cas étudiés, le corps thyroïde sécrète une protéine de structure et de composition assez constantes, dont l'ioduration est troublée. Toutefois, l'ordre de grandeur des écarts observés est tel que les faits acquis traduisent plus une probabilité qu'une certitude.

Des résultats contradictoires sur les teneurs en acides aminés de chacune des thyroglobulines préparées selon les méthodes d'OSWALD, d'HEIDELBERGER et PALMER, ou de CAVETT et SELJESKOG, ressortent de l'examen du tableau suivant :

TABLEAU XXII.

Composition de diverses préparations de thyroglobuline.

Acides aminés en p. 100 de protéine	Préparation OSWALD (Porc)	Préparation HEIDELBERGER (Porc)	Préparation CAVETT (Homme)
Arginine	8,2	—	7,4
Histidine	6,9	—	1,8
Lysine	3,9	—	5,8
Tyrosine	5,5	3,0	3,3
Tryptophane	2,2	1,9	2,0
Cystine	1,6	4,4	2,6
Méthionine	—	1,3	—

Les différences observées peuvent tenir d'une part au degré de pureté des produits analysés et d'autre part aux techniques utilisées pour les dosages. Les résultats publiés ne permettent pas de se faire une opinion définitive sur la composition des thyroglobulines.

La préparation de thyroglobuline d'HEIDELBERGER et PALMER a été soumise à l'ultracentrifugation (HEIDELBERGER et SVEDBERG [82]) afin d'en déterminer son poids moléculaire. Les valeurs trouvées pour celui-ci sont de l'ordre de 700.000. Par la suite, HEIDELBERGER et PEDERSEN [81] ont repris l'étude physico-chimique de la thyroglobuline de Porc. Leurs résultats peuvent être résumés par les données suivantes :

1°) La constante de sédimentation est de $1,92 \times 10^{-3}$ cm²/sec. (Celle de la thyroglobuline humaine est du même ordre).

2°) Le volume spécifique est de 0,72.

3°) Le point isoélectrique de la thyroglobuline initiale est de 4,58 alors que celui de la protéine dénaturée est de 5,0.

4°) Le poids moléculaire est d'environ 700.000 calculé à partir des constantes de sédimentation et de diffusion ou 650.000 quand il est déduit de l'équilibre de sédimentation.

5°) La molécule ne semble pas être sphérique.

Par ailleurs, il ressort de l'ensemble de ces travaux que la thyroglobuline est une protéine dont l'ultracentrifugation révèle l'état monodispersé dans une zone de stabilité comprise entre pH 4,8 et 11,3 [81] [120]. Elle est susceptible sous l'action de divers facteurs favorisant son ionisation (modification de la concentration en protéines, en sels, du pH , de la température, de la constante diélectrique) de se dissocier réversiblement en particules dont le diagramme de sédimentation permet dans certains cas de distinguer quatre types (LUNDGREN [121] [122] [123]). Des phénomènes d'association moléculaire ont également été observés. Les préparations de thyroglobuline même partiellement impures, monodispersées au regard de l'ultracentrifugation sont électrophorétiquement homogènes (LUNDGREN [123]).

**

Les recherches chimiques et physico-chimiques entreprises jusqu'ici l'ont été sur des produits impurs de sorte qu'il y avait lieu de la répéter sur la thyroglobuline pure. C'est ainsi que nous nous sommes proposés d'étudier les teneurs en iode total et en iode thyroxinien des thyroglobulines pures ou brutes, afin de nous rendre compte si le rapport présentait ou non une certaine fixité et s'il pouvait constituer un test de la pureté des thyroglobulines.

Par ailleurs, la composition en acides aminés des produits impurs étant très variable, il importait de la reprendre sur la thyroglobuline pure en utilisant des méthodes éprouvées et plus précises que celles précédemment adoptées. Il importait aussi d'effectuer sur un certain nombre de préparations de teneurs en iode différentes les dosages de la tyrosine afin de nous rendre compte s'il n'y avait pas un certain balancement entre les taux de cet acide aminé et la thyroxine des échantillons étudiés et éventuellement s'il n'existait pas des varia-

tions avec des préparations d'origine pathologique. En outre, il était indispensable de compléter les données permettant de caractériser la thyroglobuline par voie chimique que nous proposons d'obtenir par d'autres relevant de leurs propriétés physico-chimiques. L'une de celles-ci, sa solubilité en fonction de concentrations croissantes en sels neutres a déjà été signalée. Nous avons pu, grâce à l'obligeante collaboration du Docteur K. O. PEDERSEN d'Upsala et du Professeur DERRIEN disposer par ailleurs de données sur l'ultracentrifugation, la diffusion et l'électrophorèse des préparations purifiées.

II. — Recherches personnelles.

A. — SUR LES TENEURS EN IODE ET EN THYROXINE DES THYROGLOBULINES.

Nous avons étudié les teneurs en iode total et en iode thyroxinien de thyroglobulines brutes ou purifiées par divers procédés. L'iode a été dosé par la méthode de LEIPERT [106] ou par celle que nous avons mise au point avec LAFON [135]. L'iode thyroxinien a été déterminé soit par la technique de BLAU [21], soit par celle indiquée dans la première partie de notre travail.

Les produits ayant fait l'objet de cette étude ont porté sur les extraits bruts de thyroïde et sur leurs produits de fractionnement ceux-ci ont été préparés : 1°) par la méthode d'HEIDELBERGER et PALMER [80] basée sur l'élimination d'un nucléoprotéide accompagnant la thyroglobuline dans l'extrait brut ; 2°) par précipitation au sulfate d'ammonium des fractions de celui-ci insolubles entre 35 et 45 p. 100 de la saturation en ce sel (CAVETT et SELJESKOG [41]) ; soit par précipitation aux phosphates de potassium (entre 43 et 47 p. 100 de la teneur en solution 3,5 d'un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique), ce qui permet d'obtenir la thyroglobuline pure.

On trouvera ci-dessous les résultats obtenus sur des produits extraits de corps thyroïdes normaux, à l'exception de ceux du lot C de Pores, lesquels présentaient une très forte hyperplasie histologiquement analogue à celle du goître simple (poids moyen des glandes 60 g au lieu du poids normal 10 à 12 g).

Nature de la préparation et origine de la thyroglobuline	I total p. 100	I thyro- xinien p. 100	I thyro- xinien I total
Extrait brut (pression), Porc A (novembre 1945)	0,560	0,191	0,339
Thyroglobuline (méth. d'HEIDELBERGER), Porcs A	0,598	0,198	0,336
Thyroglobuline (frac. phosphates), Porcs A...	0,670	0,230	0,343
Extrait brut (méth. CAVETT), Porcs B (déc. 1945)	0,460	0,149	0,324
Extrait brut (pression), Porcs C (mars 1946) ...	0,084	0,0136	0,161
Extrait brut (méth. CAVETT), Porcs D (mai 1946)	0,290	0,0853	0,294
Thyroglobuline (méth. CAVETT), Porcs D.....	0,304	0,0863	0,304
Extrait brut (pression), Bœufs A (octobre 1945)	0,732	0,242	0,331
Extrait brut (pression), Bœufs B (mai 1945)	0,520	0,159	0,305
Thyroglobuline (méth. CAVETT), Bœufs C (mars 1945).....	0,530	0,155	0,294

Si l'on excepte ceux obtenus sur des glandes pathologiques (Porc C), les résultats de nos dosages traduisent trois faits. D'une part, la teneur en iode thyroxinien des thyroglobulines présente des variations assez importantes, ne tenant pas à l'origine animale du produit étudié. D'autre part, chez tous les animaux normaux (glandes de 10 à 15 g), les variations saisonnières ou alimentaires de la teneur en iode total vont de pair avec une constance relative du rapport I total/I thyroxinien, traduisant sans doute un équilibre entre les diverses réactions successives qui donnent naissance à la thyroxine. Seules, des conditions pathologiques, sévères dérèglent celui-ci. Enfin, il n'est pas possible de considérer la valeur de ce rapport comme un test de la pureté d'une thyroglobuline, puisqu'il est du même ordre de grandeur qu'il s'agisse de la thyroglobuline pure ou de l'extrait brut qui a servi à la préparer.

B. — COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE LA THYROGLOBULINE PURE.

Nous avons réuni dans un tableau les teneurs en acides aminés p. 100 de protéines de la thyroglobuline pure de Porc.

TABLEAU XXIII.

Teneur en acides aminés p. 100 de la thyroglobuline pure de Porc.

Acide aminé	Teneur en p. 100 de protéine	Acide aminé	Teneur en p. 100 de protéine
Arginine	12,72	Leucine	12,8
Histidine	2,23	Valine.....	1,45
Lysine.....	3,42	Cystine.....	3,60
Tyrosine	3,22	Méthionine (*)..	1,30
Tryptophane.....	2,08	Glycine	3,70
Phénylalanine	6,68	Alanine	4,40
Sérine.....	10,8	Thyroxine	0,21
		Diiodotyrosine..	0,52

(*) Nous tenons à remercier vivement M. le Professeur DESNUELLE qui a bien voulu effectuer pour nous le dosage de la Méthionine de la thyroglobuline pure.

Ces résultats ont été établis par les méthodes suivantes techniquement éprouvées : Arginine (DUMAZERT et POGGI [56]), Histidine (MAC PHERSON [124]), Lysine (KUHN et DESNUELLE [99]), Tyrosine (LUGG [118]), Tryptophane (LUGG [119]), Phénylalanine (ROCHE, MICHEL et MOUTTE [185]), Sérine (MICHEL et BOZZI-TICHADOU [134]), Leucine (ROCHE et MOURGUE [185]), Valine (ROCHE et MOURGUE [185]), Cystine (LUGG [116] [117]), Méthionine (*) (LAVINE [104]), Glycine (MICHEL R., MICHEL O. et TICHADOU [137] [194]), Alanine (MICHEL R. et MICHEL O. [136]).

Deux faits découlent de l'examen de ce tableau, d'une part la richesse de la thyroglobuline en arginine signalée précédemment par différents auteurs [197] [198] [57] [39], et d'autre part sa teneur élevée en sérine ce qui peut expliquer dans une certaine mesure que des thyroglobulines de teneurs différentes en iode possèdent les mêmes caractères de solubilité en présence de sels neutres. Les teneurs en tyrosine, en tryptophane sont du même ordre de grandeur que celles publiées par WHITE [197] [198] et CAVETT [39]. Par contre des différences très importantes se manifestent entre les taux de l'histidine et de la cystine dans les préparations impures de thyroglobuline et celles que nous avons obtenues sur le produit pur. Celles-ci peuvent tenir à des techniques de dosage imparfaites et au degré de pureté des échantillons.

Nous avons repris sur des préparations de thyroglobuline provenant de glandes hypertrophiées les dosages de différents acides aminés. Nous en avons rassemblé les résultats dans le tableau ci-après :

TABLEAU XXIV.

Acide aminé	Teneur en p. 100 de protéine	Acide aminé	Teneur en p. 100 de protéine
Arginine	9,20	Sérine.....	10,10
Histidine	2,10	Cystine.....	2,20
Lysine	5,10	Glycine.....	3,40
Tyrosine	8,56	Alanine	7,20
Tryptophane.....	2,08		

A l'exception de la tyrosine, de la cystine et de l'arginine la thyroglobuline provenant de glandes hypertrophiées, présente une composition en acides aminés assez voisine de celle de la thyroglobuline normale. Cette variation importante du taux de certains acides aminés nous a conduits à étudier la composition de ceux-ci de plusieurs thyroglobulines pures de divers animaux (Bœuf, Chien, Porc) normaux ou atteints de goître colloïdal afin de rechercher si des modifications éventuelles étaient ou non localisées sur la tyrosine et ses dérivés. Les résultats obtenus, exacts à ± 3 p. 100 près, ont été rassemblés ci-dessous :

TABLEAU XXV.

Teneurs en iode, en thyroxine, en tyrosine et en tryptophane p. 100 de thyroglobulines pures de divers animaux normaux ou présentant une forte hypertrophie thyroïdienne (goître colloïdal) (valeurs déterminées sur des préparations provenant de lots homogènes de glandes).

Espèce animale et état des glandes	Iode p. 100	Thyroxine p. 100	Tyro- sine p. 100	Trypto- phane p. 100	Cystine p. 100
Porc, gl. normales.....	0,72	0,38	3,15	2,13	3,60
Porc, gl. normales.....	0,48	0,21	3,12	2,08	3,55
Porc, gl. normales.....	0,47	0,21	3,06	2,11	3,52
Porc, gl. normales.....	0,35	0,17	3,12	2,08	3,66
Porc, gl. hypertr. (115 g.).....	0,04	indosable	3,56	2,08	2,20
Bœuf, gl. normales.....	0,74	0,34	3,55	2,27	3,50
Bœuf, gl. normales.....	0,63	0,29	3,50	2,28	3,35
Bœuf, gl. hypertr. (80 g.).....	0,01	indosable	5,52	2,25	1,60
Chien, gl. normales.....	0,38	—	3,46	2,28	—

Chez les animaux normaux, les écarts observés dans les teneurs en iode et en thyroxine des thyroglobulines ne vont pas de pair avec des différences sensibles dans les teneurs en tyro-

sine. Ce fait s'explique aisément si l'on considère qu'un enrichissement de 0,20 p. 100 en thyroxine (P. M. = 777) devrait être théoriquement compensé par une diminution de 0,093 p. 100 du taux de la tyrosine (P. M. = 181) dans une protéine de composition fixe en ses autres acides aminés. Les différences spécifiques des teneurs en tyrosine et en tryptophane sont faibles mais assez nettes pour que la thyroglobuline du Porc apparaisse comme plus pauvre en ces corps que celles du Bœuf et du Chien. La constance des teneurs des trois acides aminés non iodés étudiés montre par ailleurs que, dans ces conditions, la thyroglobuline doit présenter une composition toujours la même, sauf en ce qui concerne les acides aminés iodés, dont la formation au sein de la protéine doit donc être un processus indépendant de la protéinogénèse proprement dite, cette dernière donnant naissance à une thyroglobuline de composition normalement assez fixe.

Par contre, les glandes très fortement hypertrophiées sécrètent une protéine de composition anormale, elle est particulièrement plus riche en tyrosine et plus pauvre en cystine et en arginine mais non en tryptophane que celle des animaux normaux de même espèce. L'excès du premier acide aminé est alors notablement plus grand que ne permettrait de le prévoir sa non ioduration dans une protéine identique à celle propre aux animaux sains. Il en découle que les glandes pathologiques étudiées renferment une thyroglobuline différente de celle des sujets normaux. S'il n'est pas possible de discuter dans quelle mesure ces modifications de composition sont liées à un mécanisme régulateur ou compensateur il y a lieu de rapprocher l'appauvrissement en cystine des mêmes produits du fait que de nombreux « antithyroïdiens » qui provoquent par leur administration le développement de goîtres, sont des corps sulfurés (thiouracile et dérivés) et que la formation de la thyroxine *in vivo* est sous la dépendance de processus oxydo-réducteurs auxquels peuvent participer les groupements thiols [58] [59] [91] [92] [102] [163].

Le Docteur K. O. PEDERSEN et le Professeur DERRIEN ont déterminé pour nous la vitesse de migration électrophorétique, la vitesse de sédimentation et de diffusion de la thyroglobuline pure de Porc. Ils ont trouvé des valeurs voisines de celles antérieurement obtenues sur des produits moins purs, c'est-à-dire qu'elles se comportent comme une protéine homogène à l'ultra-centrifugation et à l'électrophorèse.

Conclusions générales.

Les conclusions d'ensemble qui peuvent être déduites de nos recherches sur les processus de formation de la thyroxine au cours de l'halogénéation physiologique ou chimique des protéines, sont les suivantes :

Durant l'ioduration *in vitro* la structure de la protéine intervient directement dans l'aptitude qu'a la tyrosine qu'elle renferme à donner naissance à de la thyroxine traduisant ainsi une certaine spécificité protéique.

Si l'action de l'iode sur la thyroglobuline ne présente à cet égard aucun caractère particulier, par contre il n'est pas certain que son ioduration physiologique procède par le même mécanisme que son halogénéation par voie clinique. La spécificité du corps thyroïde en tant que lieu de formation de la thyroxine semble en effet tenir à la présence d'un système enzymatique d'ioduration efficace aussi bien qu'à la nature de la protéine lui servant de substrat. Il est légitime de considérer cependant que la formation de la thyroxine doit être un processus indépendant de la protéinogénèse proprement dite puisque cette dernière donne naissance à une thyroglobuline de composition toujours la même sauf en ce qui concerne les acides aminés iodés.

Résumé et Conclusions.

L'ensemble des recherches que nous avons poursuivies a pour objet l'établissement de méthodes de dosage de la diiodotyrosine, de la monoiodotyrosine et de la thyroxine en vue de l'étude de la formation de cette dernière dans la thyroglobuline et les protéines artificiellement iodées. Les résultats que nous avons obtenus ont été discutés dans chacun des chapitres successifs de notre travail, ils peuvent être ainsi résumés.

A. — MÉTHODES DE DOSAGES.

1. La thyroxine et la diiodotyrosine seules donnent en présence d'ions nitreux la réaction colorée propre aux o. diiodophénols, tandis que la réaction de MILLON n'est positive qu'en présence de monoiodotyrosine. Par ailleurs, la thyroxine peut être quantitativement séparée de la diiodotyrosine grâce à sa solubilité dans le n. butanol et la monoiodotyrosine traitée par le réactif de MILLON donne naissance à un dérivé coloré dont les caractères spectraux ne sont pas identiques à ceux du dérivé de la tyrosine. Ces faits ont été mis à profit pour établir le dosage des trois acides aminés purs et dans leurs mélanges, additionnés ou non de tyrosine.

2. L'étude quantitative des réactions colorées de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine en présence de divers acides aminés et celle de leur stabilité dans les conditions de l'hydrolyse alcaline des protéines a permis d'appliquer à ces dernières les méthodes de dosages des dérivés iodés établis sur leurs solutions pures.

3. De techniques particulières ont été élaborées pour les produits thyroïdiens pauvres en thyroxine et en diiodotyrosine et probablement dépourvus de monoiodotyrosine, et pour les protéines artificiellement iodées, renfermant les trois acides aminés iodés à des taux relativement élevés. Elles permettent de doser la thyroxine sur 50 à 200 Mg de produits avec ± 4 p. 100 d'erreur, la diiodotyrosine sur 100 Mg avec ± 4 p. 100

d'erreur et la monoiodotyrosine à ± 7 p. 100 près sur 100 à 200 Mg.

B. — IODOPROTÉINES ARTIFICIELLES.

a. SUR LA FORMATION DE LA THYROXINE ET DE SES PRÉCURSEURS.

1. La formation de monoiodotyrosine, de diiodotyrosine et de thyroxine et la disparition de la tyrosine dans la caséine et dans la thyroglobuline soumises à l'action de quantités croissantes d'iode ont été étudiées dans diverses conditions.

2. L'iode participe à des réactions de *substitution*, particulièrement intenses en milieu ammoniacal, et à des réactions d'*oxydation*, plus importantes à pH 7,8 et en présence de bicarbonate de sodium. Les premières portent préférentiellement sur la tyrosine mais aussi sur d'autres acides aminés (histidine, phénylalanine), et cela avec une intensité croissante en fonction des quantités d'halogène mises en œuvre. L'ioduration d'une protéine n'affecte spécifiquement la tyrosine qu'à des taux d'halogène très faibles:

3. De la monoiodotyrosine est présente en abondance dans les produits faiblement iodés ; elle se transforme progressivement en diiodotyrosine sous l'action de quantités plus grandes d'iode, une fraction du dérivé disubstitué donnant alors simultanément naissance à de la thyroxine. La formation de celle-ci n'est pas seulement fonction de la *teneur* en tyrosine d'une protéine, toutes choses étant égales du côté des conditions de l'ioduration. La *position* de cet acide aminé dans la molécule protéique détermine sa réactivité. Une fraction importante de la diiodotyrosine paraît inapte à donner naissance à de la thyroxine.

4. Des processus d'oxydation altèrent la thyroxine au cours de l'halogénéation des protéines surtout en milieu bicarbonaté à pH 7,8 ; ils décomposent également une partie de la tyrosine et de ses dérivés de substitution. L'existence d'un optimum de rendement en thyroxine en présence de 6 à 7 atomes d'iode par molécule de tyrosine illustre l'importance de ces réactions lors de la mise en œuvre d'un excès d'halogène.

5. La caséine s'iode plus facilement et plus intensément que la thyroglobuline toutes choses étant égale du côté des quantités d'halogène réagissant avec une même quantité de tyrosine. Néanmoins, l'une et l'autre donnent naissance à des quan-

tités de thyroxine correspondant à des proportions très voisines de la tyrosine totale qu'elles renferment. Il en découle que la thyroglobuline ne présente aucune aptitude particulière à la formation de thyroxine par ioduration chimique.

B. ACTION DE L'IODE SUR LE TRYPTOPHANE.

1. L'ioduration de la caséine et de la thyroglobuline dans diverses conditions provoque une diminution progressive de la teneur en tryptophane de ces protéines, déterminée par la méthode de LUGG, dont l'application aux protéines iodées a été réalisée. Les faits observés peuvent traduire soit la formation d'un dérivé iodé du tryptophane, soit l'oxydation de celui-ci.

2. La désioduration au moyen du stannite de sodium des protéines halogénées libère de la tyrosine et de la monoiodotyrosine à partir de la diiodotyrosine. Elle ne fait par contre, pas réapparaître de tryptophane. Il est donc très peu probable que les iodoprotéines renferment un dérivé iodé de celui-ci.

3. Le tryptophane traité par l'iode en solution neutre ou faiblement alcaline est oxydé sans donner naissance préalablement à un dérivé de substitution, car la totalité de l'halogène réagissant est réduit en acide iodhydrique. Il y a tout lieu d'admettre qu'il en est de même dans les protéines dont la tyrosine et l'histidine sont, dès lors, les seuls acides aminés dont celles-ci renferment en quantités importantes des dérivés iodés après action de l'halogène.

C. — PROTÉINES THYROIDIENNES.

a. PRÉPARATION DE LA THYROGLOBULINE PURE.

1. L'étude de la solubilité à concentrations croissantes de divers sels neutres (sulfate d'ammonium, sulfate de sodium, mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique) des protéines représentés dans les extraits bruts de corps thyroïde (Bœuf, Cheval, Chien, Porc) a permis de définir les constituants protéiques de ces milieux et d'y localiser trois fractions thyroglobuliniques. Celles-ci présentent des caractères de solubilité constants en présence d'un sel neutre déterminé, à un pH et à une température bien définie en sorte que l'on peut les séparer des protéines qui les accompagnent en se basant sur nos observations. La dénaturation de ces fractions, très sensibles à des pH inférieurs à 5,0, provoque une importante dimi-

nution de leur solubilité et peut être décelée grâce à celle-ci. L'étude de la teneur en iode et en phosphore des protéines précipitées à des concentrations croissantes en sels neutres a permis de préciser les conditions dans lesquelles il convient de se placer pour réaliser cette opération en obtenant une protéine non dénaturée, dépourvue d'impuretés phosphorées (nucloéoprotéïdes et lipoprotéïdes) et dont la teneur en iode est uniforme dans toutes les fractions. L'examen des produits préparés par les méthodes antérieurement décrites y a décelé des impuretés non iodées en proportion appréciable et, dans certains cas, des produits de dénaturation de la thyroglobuline.

2. Les caractères de solubilité des préparations de thyroglobuline sont indépendants de sa teneur en iode et en acides aminés iodés. Par ailleurs, cette protéine présente à certains égards la même composition dans toutes les fractions que l'on a pu en séparer par des précipitations successives à des concentrations croissantes en divers sels neutres. Il en découle que la teneur en iode des thyroglobulines pures doit être considérée comme variable et que le taux de ce constituant ne saurait servir de critère pour apprécier le degré de pureté des préparations.

3. Dans les extraits thyroïdiens comme dans les préparations purifiées, la thyroglobuline est comprise dans trois fractions protéïques qu'il est possible de distinguer par leur caractère de solubilité (courbes de relargage et test de NORTROP). Ces trois fractions sont iodées à un même taux et il est probable qu'elles correspondent à des degrés d'association des molécules de thyroglobuline dans les conditions où nous nous sommes placés.

4. Aucune différence de solubilité n'a été relevée entre les thyroglobulines de mammifère de diverses espèces. Il en découle que la méthode de préparation proposée peut être appliquée sans adaptation particulière aux organes de Bœuf, de Cheval, de Chien et de Porc.

b. PROPRIÉTÉS DE LA THYROGLOBULINE.

1. L'iode des thyroglobulines pures est variable et le rapport I thyroxinien/I total est voisin de 0,3 pour les thyroglobulines normales de divers animaux ce qui traduit sans doute un équilibre entre les diverses réactions successives qui donnent naissance à la thyroxine. La teneur de la thyroglobuline

pure de Porc en treize acides aminés a été déterminée, cette protéine est particulièrement riche en arginine, leucine et sérine. La thyroglobuline est probablement une protéine de structure définie et de composition pratiquement constante en acides aminés non iodés, mais dont le degré d'ioduration est physiologiquement variable.

2. La composition de la thyroglobuline provenant des glandes hypertrophiées de Porc ou de Bœuf (goître colloïdal) montre que cette protéine est très pauvre en iode et que le rapport $\frac{\text{Iode thyroïdien}}{\text{Iode total}}$ est inférieur à 0,3. Cependant, à l'exception de la thyrosine d'une part, de la cystine et de l'arginine d'autre part, la première plus abondante, les secondes moins, que pour les thyroglobulines normales, les taux des autres acides aminés restent sensiblement constants.

3. La thyroglobuline pure de Porc est homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ABELIN (I.). — *Biochem. Ztschr.*, 1931, **233**, 483.
2. ABELIN (I.). — *Arch. f. exper. Path. u. Pharmac.*, 1934, **173**, 146.
3. ABELIN (I.). — *Arch. f. exper. Path. u. Pharmac.*, 1934, **175**, 151.
4. ABELIN (I.). — *Klin. Woch.*, 1934, **13**, 940.
5. ABELIN (I.). — *Arch. f. exper. Path. u. Pharmac.*, 1936, **181**, 250.
6. ABELIN (I.). — *Helv. chim. Act.*, 1942, **25**, 1421.
7. ABELIN (I.), FLORIN (A.). — *Arch. f. Exper. Path. u. Pharmac.*, 1933, **171**, 483.
8. ABELIN (I.) et KELLER (A.). — *Helv. chim. Act.*, 1939, **22**, 1365.
9. ABELIN (I.) et NEFTEL (A.). — *Arch. f. exper. Path. u. Pharmac.*, 1938, **189**, 473.
10. ALBRIEUX (A. S.) et ROCA (F.). — *Arch. Soc. Biol.*, Montevideo, 1944, **12**, 139.
11. BARKDOLL (A. E.) et ROSS (W. F.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 898.
12. BARNES (B. O.) et JONES (M.). — *Amer. J. Physiol.*, 1933, **105**, 556.
13. BAUER (H.) et STRAUSS (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1929, **211**, 163.
14. BAUER (H.) et STRAUSS (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1936, **284**, 197.
15. BAUER (H.) et STRAUSS (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1936, **284**, 231.
16. BAUMANN (E.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1895-96, **21**, 319.
17. BAUMANN (E.) et ROOS (E.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1895, **21**, 481.
18. BERGER (L.) et SCHEFFER (P. A.). — *Feder. Proc.*, 1946, **5**, 121.
19. BERNHART (F. W.). — *Proc. Amer. Soc. biol. Chem.*, *J. biol. Chem.*, 1938, **123**, 10.
20. BLAU (N. F.). — *J. biol. Chem.*, 1933, **102**, 269.
21. BLAU (N. F.). — *J. biol. Chem.*, 1935, **110**, 351.
22. BLAXTER (K. L.). — *J. Endocrinol.*, 1945, **4**, 237.
23. BLAXTER (K. L.). — *J. Agric. Sc.*, 1946, **36**, 117.
24. BLOCK (P.). — *J. biol. Chem.*, 1940, **135**, 51.
25. BLUM (F.). — *Verhandl. Kong. inn. Med.*, 1897, **15**, 226.
26. BLUM (F.). — *Münch. Med. Wochschr.*, 1898, 231.
27. BLUM, LEHMAN et LEISTNER cité d'après RAUCH (S.). — *Zur Chemie und Physiologie des düdotyrosinhaltigen Bestandteile des Thyroglobulins*. These doct. Med., Berne, 1945, 76.
28. BLUM (F.) et STRAUSS (E.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1921, **112**, 111.
29. BLUM (F.) et STRAUSS (E.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1923, **127**, 199.
30. BLUM (F.) et VAUDEL (W.). — *J. f. prakt. Chem.*, 1897, **57**, 393.
31. BLUM (F.) et VAUBEL (W.). — *J. f. prakt. Chem.*, 1898, **57**, 365.
32. BÖHM (R.) et BERG (F.). — *Arch. f. exper. Path. u. Pharmac.*, 1876, **5**, 329.
33. BONOT (A.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 1417.

34. BRAND (E.) et KASSEL (B.). — *J. biol. Chem.*, 1939, **131**, 489.
35. BRAND (E.), KASSEL (B.) et HEIDELBERGER (M.). — *J. biol. Chem.*, 1939, **128**, 11.
36. BRANDT (W.), MATTIS (H.) et NOLTE (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1931, **243**, 369.
37. BRUNINGS (K. J.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 205.
38. BURNOW (N. A.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1884, **8**, 1.
39. CAVETT (J. W.). — *J. biol. Chem.*, 1936, **114**, 65.
40. CAVETT (J. W.), RICE (C. O.) et MAC CLENDON (J. F.). — *J. biol. Chem.*, 1935, **110**, 673.
41. CAVETT (J. W.) et SELJESKOG (S. R.). — *J. biol. Chem.*, 1933, **100**, 24.
42. COHN (E. J.). — *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349.
43. COHN (E. J.). — *Ergebn. d. Physiol.*, 1931, **33**, 781.
44. COHN (E. J.). — 1941, **28**, 395.
45. COHN (E. J.). — *Experientia*, 1947, **3**, 125.
46. COHN (E. J.), LUETSCHER jr. (J. A.), ONCLEY (J. L.), ARMSTRONG jr. (S. H.) et DAVIS (D. B.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 3396.
47. COHN (E. J.), MAC MEEKIN (T. L.), ONCLEY (J. L.), NEWELL (J. M.), et HUGUES (W. L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 3386.
48. COHN (E. J.), SALTER (W. T.) et FERRY (R. J.). — *J. biol. Chem.*, 1938, **123**, 24.
49. CUNY (L.) et ROBERT (J.). — *J. Pharmac. chim.*, 1933, **18**, 233.
50. CURLIN (L.). — Ph. D. Dissertation. University of Chicago, 1939.
51. De GENNES (L.) et DELTOUR (G.). — *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1947, **23**, 685.
52. DEANESLY (R.) et PARKES (A. S.). — *J. Endocrinol.*, 1945, **4**, 356.
53. DERRIEN (Y.). — Thèse Doct. Sci. Marseille, 1946.
54. DERRIEN (Y.). — Särtryck ur Svensk Kemisk Tidskrift, 1947, **59**, 139.
55. DRECHSEL (E.). — *Ztschr. Biol.*, 1896, **33**, 85.
56. DUMAZERT (C.) et POGGI (R.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 1381.
57. ECKSTEIN (H. C.). — *J. biol. Chem.*, 1926, **67**, 601.
58. FRANKLIN (A. L.) et CHAIKOFF (I. L.). — *J. biol. Chem.*, 1944, **152**, 295.
59. FRANKLIN (A. L.), CHAIKOFF (I. L.) et LERNER (S. R.). — *J. biol. Chem.*, 1944, **153**, 151.
60. GOURLAY (F.). — *J. Physiol.*, 1894, **16**, 23.
61. GUDERNATSCH (J. F.). — *Arch f. Entwicklungsmechn. d. Organ.*, 1912-13, **35**, 457.
62. GUDERNATSCH (J. F.). — *Am. J. Anat.*, 1913, **15**, 431.
63. HAMILTON (J. G.). — *Amer. J. Physiol.*, 1938, **124**, 667.
64. HARRINGTON (C. R.). — *Biochem. J.*, 1926, **20**, 293.
65. HARRINGTON (C. R.). — *Biochem. J.*, 1926, **20**, 300.
66. HARRINGTON (C. R.). — *Biochem. J.*, 1928, **22**, 1429.
67. HARRINGTON (C. R.). — Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe II, 1933, 1 vol. 366 p. (réf. p. 112), J. Springer ed. Wien.
68. HARRINGTON (C. R.). — Revue d'ensemble sur les récentes acquisitions de la biochimie du corps thyroïde (*J. Chem. Soc.*, 1944, 193).
69. HARRINGTON (C. R.). — Revue d'ensemble sur la biosynthèse et l'immunologie de la thyroxine, *Proc. Roy. Soc. London B.*, 1944, **132**, 223.
70. HARRINGTON (C. R.) et BARGER (G.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 169.

71. HARRINGTON (C. R.) et PITT RIVERS (R. V.). — *Nature*, 1939, **144**, 205.
72. HARRINGTON (C. R.) et PITT RIVERS (R. V.). — *Biochem. J.*, 1944, **38**, 320.
73. HARRINGTON (C. R.), PITT RIVERS (R. V.). — *Biochem. J.*, 1945, **39**, 157.
74. HARRINGTON (C. R.) et NEUBERGER (A.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 809.
75. HARRINGTON (C. R.) et RANDALL (S. S.). — *Quart. J. Pharmac.*, 1929, **2**, 501.
76. HARRINGTON (C. R.) et RANDALL (S. S.). — *Biochem. J.*, 1929, **23**, 373.
77. HARRINGTON (C. R.) et RANDALL (S. S.). — *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1031.
78. HARRINGTON (C. R.) et SALTER (W. T.). — *Biochem. J.*, 1930, **24**, 456.
79. HAUROVITZ (F.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1935, **232**, 146.
80. HEIDELBERGER (M.) et PALMER (W. W.). — *J. biol. Chem.*, 1933, **101**, 433.
81. HEIDELBERG (M.) et PEDERSEN (K. O.). — *J. gen. Physiol.*, 1935, **19**, 95.
82. HEIDELBERGER (M.) et SVEDBERG (T.). — *Science*, 1934, **80**, 414.
83. HENZE (M.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1907, **51**, 64.
84. HERRIOTT (R.). — *J. gen. Physiol.*, 1941, **25**, 185.
85. HERRIOTT (R. M.). — Revue générale sur l'halogénéation des protéines, pp. 205-209 in *Recent Advances in Protein Chemistry III*, 1946, 1 vol. 524 p. Acad. Press. ed. New-York.
86. HOFMEISTER (F.). — *Z. f. physiol. Chem.*, 1898, **24**, 159.
87. HUTCHISON (R.). — *J. Physiol.*, 1896, **20**, 474.
88. HUTCHISON (R.). — *J. Physiol.*, 1898-99, **23**, 178.
89. INGVALDESEN (T.) et CAMERON (A. T.). — *Proc. Trans. Roy. Soc. Canad* (3) sect 5, 1926, **20**, 297.
90. JOHNSON (T. B.) et TEWKESBURY (L. B. Jr.). — *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1942, **28**, 73.
91. JOLIOT (F.), BOVET (D.), COURRIER (R.), HOREAU (A.), SUE (P.) et POUMEAU-DELILLE (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **5**, 278.
92. JOLIOT (F.), COURRIER (R.), HOREAU (A.) et SUE (P.). — *C. R. Acad.*, 1944, **218**, 769.
93. KAER (E.). — *Klin. Woch.*, 1934, **13**, 11.
94. KAY (H. D.). — Communication en VII^e Congrès de Chimie biologique, Liège, Octobre 1946.
95. KENDALL (E. C.). — *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 1915, **30**, 420.
96. KENDALL (E. C.). — *J. A. M. A.*, 1915, **64**, 2042.
97. KENDALL (E. C.). — *J. biol. Chem.*, 1919, **39**, 125.
98. KENDALL (E. C.) et OSTERBERG (A. T.) — *J. biol. Chem.*, 1919, **40**, 265.
99. KUHN (R.) et DESNUELLE (P.). — *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, 1937, **70**, 1907.
100. KURAJEFF (D.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1899, **26**, 462.
101. KURAJEFF (D.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1901, **31**, 527.
102. LARSON (F. R.). — *Endocrinol.*, 1945, **36**, 160.
103. LAUTENSCHLAGER (C. L.) et BOCKMUHL (M.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1942, **274**, 104.
104. LAVINE (T. F.). — *Federation Proceed*, 1942, **1**, 1920.
105. LEBLOND (C. P.). — *J. Anat.*, 1943, **77**, 149.
106. LEIPERT (T.). — *Mikrochem. (Pregl's Festschrift)*, 1929, 266.
107. LELAND (J.) et FOSTER (G. L.). — *J. biol. Chem.*, 1932, **95**, 165.

108. LERMANN (J.) et SALTER (W. T.). — *Endocrinology*, 1939, **25**, 712.
109. LI (C. H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 1147.
110. LI (H. C.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 225.
111. LI (H. C.). — *J. Amer. chem. Soc.*, 1945, **67**, 1065.
112. LI (H. C.), LYONS (W. R.) et EVANS (E. M.). — *J. biol. Chem.*, 1941, **139**, 43.
113. LIEBEN (F.) et LASZLO (D.). — *Biochem. Ztschr.*, 1925, **159**, 110.
114. LUDWIG (W.) et von MUTZENBECHER (P.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **244**, IV.
115. LUDWIG (W.) et von MUTZENBECHER (P.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, **258**, 195.
116. LUGG (J. W. H.). — *Biochem. J.*, 1932, **26**, 2144.
117. LUGG (J. W. H.). — *Biochem. J.*, 1932, **26**, 2160.
118. LUGG (J. W. H.). — *Biochem. J.*, 1937, **31**, 1423.
119. LUGG (J. W. H.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 775.
120. LUNDGREN (H. P.). — *Nature*, 1936, **138**, 122.
121. LUNDGREN (H. P.). — *J. Phys. Chem.*, 1938, **6**, 177.
122. LUNDGREN (H. P.). — *J. biol. Chem.*, 1941, **138**, 294.
123. LUNDGREN (H. P.) et WILLIAMS (J. W.). — *J. Phys. Chem.*, 1939, **43**, 984.
124. MAC PHERSON (H. T.). — *Biochem. J.*, 1942, **36**, 59.
125. MAC CLENDON (J. F.), FORSTER (W. C.) et CAVETT (J. W.). — *Endocrinology*, 1940, **29**, 927.
126. MAC CLENDON (J. F.) et FORSTER (W. C.). — *Federation Proceed.*, 1944, **3**, 60.
127. MANDEL (S.). — Thèse Doct. Pharm., Marseille, 1946.
128. MARENZI (A. D.) et VILALLONGA (F.). — *Pubs. Centro. invest. fisiol.*, Buenos-Aires, 1941, **5**, 271.
129. MEANS (J. H.), LERMANN (J.) et SALTER (W. T.). — *Journ. of clin. Investig.*, 1933, **12**, 683.
130. MEYER (A. E.) et DANOW (H.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1940, **44**, 439.
131. MEYER (A. E.) et RANSON (G. V.). — *Endocrinology*, 1945, **36**, 259.
132. MICHEL (R.). — Recherches sur la biochimie de la phénylalanine. Thèse Doct. Pharm. Etat, Marseille, 1944, 1 vol., 90 p. Declume édit., Lons-le-Saunier.
133. MICHEL (R.). — *Bull. Soc. Chim.*, 5^e série, 1945, **12**, 546.
134. MICHEL (R.) et BOZZI (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 884.
135. MICHEL (R.) et LAFON (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1945, **27**, 644.
136. MICHEL (R.) et MICHEL (O.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 886.
137. MICHEL (R.), MICHEL (O.) et TICHADOU (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 881.
- 137 bis MICHEL (R.) et PITT-RIVERS (R.). — *Bioch. et Biophys. Act.*, 1948, **2**, 223.
138. MORTOV (M. E.) et CHAIKOFF (I. L.). — *J. biol. Chem.*, 1943, **147**, 1.
139. MOURGUE (M.) et DUMAZERT (C.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 1121.
140. VON MUTZENBECHER (P.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, **261**, 253.
141. MUUS (J.), COONS (A. H.) et SALTER (W. T.). — *J. biol. Chem.*, 1941, **139**, 135.
142. NEUBERG (C.). — *Biochem. Ztschr.*, 1910, **24**, 423.
143. NEUBERGER (A.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 1982.

144. NORTHROP (J. H.) et KUNITZ (M.). — *J. gen. Physiol.*, 1930, **13**, 781.
145. OSWALD (A.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1899, **27**, 14.
146. OSWALD (A.). — *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 1909, **60**, 115.
147. OSWALD (A.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, **62**, 432.
148. OSWALD (A.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1910, **70**, 310.
149. OSWALD (A.). — *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 1910, **63**, 263.
150. OSWALD (A.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1911, **70**, 310.
151. OSWALD (A.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1911, **71**, 200.
152. PAAL (H.) et MOTZ (G.). — *Biochem. Ztschr.*, 1935, **279**, 106.
153. PARKES (A. S.). — *Endocrinol.*, 1946, **4**, 426.
154. PAULY (H.). — *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1910, **43**, 2243.
155. PAULY (H.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1911, **76**, 291.
156. PAULY (H.) et GUNDERMANN (K.). — *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1908, **41**, 3999.
157. PITT RIVERS (R. V.). — Communication au XI^e Congrès international de Chimie, Londres, 1947.
158. PITT RIVERS (R. V.). — *Nature*, 1948, **162**, 308.
159. PITT RIVERS (R. V.) et RANDALL (S. S.). — *J. Endocrinol.*, 1945, **4**, 211.
160. PUMMERER (R.). — *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1919, **52**, 1403.
161. PUMMERER (R.), MELAMED (D.) et PUTTFARKCHEN (H.). — *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1922, **55**, 3116.
162. PUMMERER (R.), PUTTFARKCHEN (H.) et SCHOPFLOCKER (P.). — *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1925, **58**, 1808.
163. RAWSON (R. W.), TANNHEIMER (J. F.) et PEACOCK (W.). — *Endocrinol.*, 1944, **34**, 245.
164. REINEKE (E. P.). — *Vitamins and Hormones*, 1946, vol. IV, 207.
165. REINEKE (E. P.) et TURNER (C. W.). — *J. Dairy, Sc.*, 1942, **25**, 393.
166. REINEKE (E. P.) et TURNER (C. W.). — *Agr. Exp. Sta. Mo., Res. Bul.*, 1942, 355.
167. REINEKE (E. P.) et TURNER (C. W.). — *Missouri Agr. Exp. Sc. Bull.*, 1942, 855.
168. REINEKE (E. P.) et TURNER (C. W.). — *J. biol. Chem.*, 1943, **149**, 555.
169. REINEKE (E. P.) et TURNER (C. W.). — *J. biol. Chem.*, 1943, **149**, 563.
170. REINEKE (E. P.) et TURNER (C. W.). — *Endocrinol.*, 1945, **36**, 200.
171. REINEKE (E. P.) et TURNER (C. W.). — *J. biol. Chem.*, 1945, **613**, 161.
172. REINEKE (E. P.), TURNER (C. W.), KOHLER (G. O.), HOOVER (R. D.) et BEEZLEY (M. B.). — *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 599.
173. REINEKE (E. P.), WILLIAMSON (M. B.) et TURNER (C. W.). — *J. biol. Chem.*, 1942, **143**, 285.
174. REINEKE (E. P.), WILLIAMSON (M. B.) et TURNER (C. W.). — *J. biol. Chem.*, 1943, **147**, 115.
175. RIVIÈRE (C.), GAUTRON (G.) et THELY (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224**, 423.
176. ROCHE (A.) et MARQUET (F.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **17**, 1630.
177. ROCHE (J.) et DERRIEN (Y.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, **28**, 838.
178. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et CAHNMANN (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 146.
179. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et MANDEL (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 651.

180. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et MOUTTE (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **135**, 1235.
 181. ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et VIEIL (H.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1017.
 182. ROCHE (J.), MICHEL (R.) et LAFON (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947.
 183. ROCHE (J.), MICHEL (R.) et MOUTTE (M.). — *Travaux Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 1324.
 184. ROCHE (J.), MICHEL (R.) et MOUTTE (M.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1944, **11**, 490.
 185. ROCHE (J.) et MOURGUE (M.). — *Travaux Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 1345.
 186. ROGOFF (J. M.) et MARINE (D.). — *J. Pharm. Exptl. Pharmacol.*, 1916, **9**, 57.
 187. SALTER (W. T.). — *The Endocrine function of iodine*. 1 vol., 352 p. Harvard University Press, 1940.
 188. SALTER (W. T.) et LERMAN (J.). — *Tr. A. Am. Physicians.*, 1938, **53**, 202.
 189. SANKARAN (G.) et PATNAIK (M.). — *Indian J. Med. Res.*, 1935, **23**, 223.
 190. SCHMIDT (C. L. H.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1902, **35**, 386.
 191. SIMPSON (G. K.) et TRAILL (D.). — *Biochem. J.*, 1946, **40**, 116.
 192. STRAUSS (E.) et GRÜTZNER (R.). — *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1920, **112**, 167.
 193. TAUROG (A.) et CHAIKOFF (I. L.). — *J. biol. Chem.*, 1946, **163**, 323.
 194. TICHADOU (M.). — Thèse Doct. Pharm. Marseille, 1947.
 195. TREVOROW (V.). — *J. biol. Chem.*, 1939, **127**, 737.
 196. WHEELER (H. C.) et JAMLESON (G. S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1905, **33**, 365.
 197. WHITE (A.). — *Proceed. Soc. exp. Biol.* (N. Y.), 1935, **32**, 1558.
 198. WHITE (A. W.) et GORDON (W. G.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.* N. Y., 1934, **32**, 354.
 199. WINNICK (P. S.) et SCHMIDT (C. L. A.). — *J. Gen. Physiol.*, 1935, **18**, 892.
 200. WORMALL (A.). — *J. exper. Med.*, 1930, **51**, 295.
-

TABLE DES MATIÈRES.

	Page
INTRODUCTION. <i>Protéines thyroïdiennes et iodoprotéines artificielles</i>	7
<i>Plan des recherches</i>	12
PREMIÈRE PARTIE.	
Dosage colorimétrique de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine. — Application aux protéines iodées....	13
INTRODUCTION	13
<i>Propriétés.</i> — 1. Thyroxine	13
2. Diiodotyrosine	14
3. Monoiodotyrosine	14
I. — <i>Dosages de la thyroxine</i>	15
A. — <i>Hydrolyse</i>	15
a) <i>Stabilité</i>	15
1°) <i>Action de la soude</i>	15
2°) <i>Action de la baryte</i>	16
b) <i>Libération de la molécule protéique</i>	16
c) <i>Conditions particulières d'hydrolyse</i>	16
B. — <i>Dosage de la thyroxine</i>	17
II. — <i>Dosages de la diiodotyrosine</i>	20
Recherches personnelles.	
I. — <i>Dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine en solution pure et dans leur mélange en présence d'autres acides aminés</i>	22
1. <i>Etude de la réaction colorée de la thyroxine et de la diiodotyrosine et dosage de ces corps à l'état pur</i>	22
2. <i>Spécificité de la réaction</i>	24
3. <i>Dosage de la thyroxine et de la diiodotyrosine dans leurs mélanges</i>	25
II. — <i>Dosage de la monoiodotyrosine en solution pure et en présence de divers acides aminés</i>	26
1. <i>Application à la monoiodotyrosine du dosage colorimétrique de la tyrosine (LUGG)</i>	26

2. Etude spectrophotométrique de la réaction de MILLON en présence de tyrosine et de mono- iodotyrosine et dosage de ces acides aminés dans leur mélange	27
3. Principe de la méthode de dosage.....	28
4. Mode opératoire et résultats	31
III. — <i>Dosage de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine dans les iodoprotéines naturelles et artificielles</i>	32
A. — Dosage de la thyroxine	32
1. Cas des protéines thyroïdiennes :	32
Mode opératoire	33
2. Cas des protéines iodées :	34
Principe de la méthode.....	35
Mode opératoire	36
Justification de la méthode	37
B. — Dosage de la diiodotyrosine	39
Justification des divers temps du dosage.....	39
Mode opératoire	43
C. — Dosage de la monoiodotyrosine	45
Mode opératoire	46
CONCLUSIONS	47

DEUXIÈME PARTIE.

Iodoprotéines artificielles	49
INTRODUCTION	49
a) Préparation des iodoprotéines et action de l'iode sur les acides aminés.....	49
b) Formation de thyroxine par ioduration des pro- téines	54
c) Mécanisme chimique de formation de la thyroxine.	58
PRINCIPAUX PROBLÈMES POSÉS PAR L'IODURATION DES PRO- TÉINES ET OBJET DU TRAVAIL	61

Recherches personnelles.

1^{er} CHAPITRE.

SUR LA FORMATION DE LA THYROXINE ET DE SES PRÉCURSEURS DANS LES IODOPROTÉINES	62
a) Plan des recherches, matériel d'étude et techniques	62
b) Résultats expérimentaux	65
c) Examen critique des résultats	65
d) Discussion des résultats	71
1. Sur la fixation de l'iode à la tyrosine dans les protéines	71

2. Sur la formation de la thyroxine et sur la dégradation de la tyrosine et de ses dérivés au cours de l'ioduration des protéines	73
3. Constitution des protéines et ioduration de la caséine et de la thyroglobuline.....	74

2^e CHAPITRE. . .

ACTION DE L'IODE SUR LE TRYPTOPHANE DANS LES PROTÉINES ET A L'ÉTAT LIBRE	77
A. — Action de l'iode sur le tryptophane dans les protéines	77
B. — Action de l'iode sur le tryptophane en solution pure	80
C. — Discussion des résultats et conclusions.....	82

TROISIÈME PARTIE.

Protéines thyroïdiennes	84
Objet des recherches	84

1^{er} CHAPITRE.

ETUDE DE LA PRÉPARATION DE LA THYROGLOBULINE.....	85
I. — <i>Travaux antérieurs</i>	85
II. — <i>Recherches personnelles</i>	87
A. — Techniques	87
B. — Étude des protéines des extraits thyroïdiens..	89
C. — Élimination des impuretés protéiques, dénatura- tion et préparation de la thyroglobuline..	94
D. — Répartition de l'iode dans les extraits thyroï- diens et préparation de la thyroglobuline pure.	99
Préparation de la thyroglobuline pure.....	101
III. — <i>Discussion des résultats</i>	105
A. — Teneur en iode et pureté de la thyroglobuline	105
B. — Sur l'hétéogénéité de la thyroglobuline.....	106

2^e CHAPITRE.

PROPRIÉTÉS DE LA THYROGLOBULINE	109
I. — <i>Travaux antérieurs</i>	109
II. — <i>Recherches personnelles</i>	113
a) Sur les teneurs en iode et en thyroxine des thyroglobulines	113
b) Composition en acides aminés de la thyroglo- buline pure	114

CONCLUSIONS GÉNÉRALES	118
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	119
A. — Méthodes de dosages	119
B. — Iodoprotéines artificielles	120
C. — Protéines thyroïdiennes	121
BIBLIOGRAPHIE	125
TABLE DES MATIÈRES	131



M. DECLUME, Imp., Lons-le-Saunier (31.2160). — 532-50-400.

Octobre 1950 « Dépôt légal 4^e trimestre 1950 — N° 3902 ».

